

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 25 September 1997 (25.09.97)	
International application No.: PCT/EP96/01130	Applicant's or agent's file reference: 13834P WO
International filing date: 15 March 1996 (15.03.96)	Priority date:
Applicant: MAURER, Jochen et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:
05 May 1997 (05.05.97)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer: J. Zahra
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 22 May 1997 (22.05.97)	
International application No. PCT/EP96/01130	Applicant's or agent's file reference 13834P WO
International filing date (day/month/year) 15 March 1996 (15.03.96)	Priority date (day/month/year)
Applicant MAURER, Jochen et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
05 May 1997 (05.05.97)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer G. Bähr
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 730.91.11

SDCO

PCT/EP96/01130

91 1471036 P

NT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
DOCUMENT TRANSMITTED

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

09 September 1998 (09.09.98)

International application No.

PCT/EP96/01130 ✓

International filing date (day/month/year)

15 March 1996 (15.03.96)

Applicant

MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V., BERLIN et al

The International Bureau transmits herewith the following documents and number thereof:

_____ copy of the English translation of the international preliminary examination report (Article 36(3)(a))

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

P. Asseeff

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PCT COOPERATION TREATY

PCT
NOTIFICATION OF TRANSMITTAL
OF COPIES OF TRANSLATION
OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 72.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Weickmann**E 17. SEP. 1998**

WEICKMANN, H.,
 Kopernikusstrasse 9
 D-81679 München
 ALLEMAGNE

Frist:
 Patentanwälte

Date of mailing (day/month/year) 09 September 1998 (09.09.98)	
Applicant's or agent's file reference 13834P WO	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/EP96/01130 ✓	International filing date (day/month/year) 15 March 1996 (15.03.96)
Applicant MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V., BERLIN et al	

1. Transmittal of the translation to the applicant.

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

CA,CN,JP,KR,NZ,US


The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

EP,AU

3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rule 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer P. Asseff  Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--



ES
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

Welckmann

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

17 SEP 1998

Frist:
Patentanwälte

Applicant's or agent's file reference 13834P WO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP96/01130	International filing date (day/month/year) 15 March 1996 (15/03/96)	Priority date (day/month/year)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/62, 15/65, 15/70, C07K 16/00		
Applicant MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSC		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet. <input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of <u>5</u> sheets.
3. This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 05 May 1997 (05/05/97)	Date of completion of this report 30 July 1998 (30/07/98)
Name and mailing address of the IPEA/EP European Patent Office D-80298 Munich, Germany Facsimile No. 49-89-2399-4465	Authorized officer Telephone No. 49-89-2399-0



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP96/01130

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1 - 39, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages _____, filed with the letter of _____,
pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. 1 - 19, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. 20 - 38, filed with the letter of 06 July 1998 (06/07/98),
Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/28-28/28, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 96/01130**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1 - 38	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1 - 38	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 38	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. The present international application concerns a process for preparing stable fusion proteins consisting of a carrier protein and a passenger protein, the expression of the fusion proteins resulting in the exposure of the passenger domains on the surface of gram-negative host bacteria cells. The present international application further concerns vectors and host-vector combinations for use in the above-mentioned process.

In the light of the international search report citations, claims 1 to 38 of the present international application must be considered novel (PCT Article 33(2)).

2. In order to assess inventive step in claims 1 to 38 of the present international application, D1 (WO-A-95/17509) is considered the closest prior art. D1 describes a process for the presentation of peptides or polypeptides on the surface of gram-negative host bacteria and a process for preparing a variant population of surface-exposed peptides or



polypeptides. These processes comprise the following steps:

- a) preparation of fusion genes by cloning the coding sequence of a desired passenger (antigen-binding domain of an antibody, an antigen, a receptor, a ligand, a nucleic acid-binding protein, an inhibitor or a protein having enzymatic activity) in a frame with the coding sequence of the transport domain of an autotransporter (IgA- β -transport domain) and of a signalling peptide into at least one vector;
- b) varying the passenger peptide or polypeptide by mutagenesis;
- c) introducing the vector(s) into host bacteria (*E. coli*) which can present the passenger(s) stably on the surface;
- d) expressing the fusion gene(s) into the host bacteria; and
- e) cultivating the bacteria to produce the passenger(s) stably exposed on the surface.

The host bacteria which present the fusion protein(s) stably on their surface can be isolated by interaction with the passenger protein binding partner bonded to a matrix, by interaction with a fluorescence-marked binding partner or by



interaction with the passenger protein binding partner bonded on magnetic particles (see D1, page 8, line 14 to page 14, line 28, examples 2 to 5).

The subjects of claims 1 to 38 differ from the closest prior art in that the *E. coli* AIDA-I transport domain is used instead of the IgA- β -transport domain, and the host bacteria is homologous to the nucleic acid section coding for the transporter domain.

The document Mol. Microbiol. 18 (1995), pp. 377 to 382, gives an overview of the existing prior art as concerns the preparation of stable fusion proteins which can present a passenger protein on the surface of a host cell by means of a transporter domain. Various presumed bacterial autotransporter proteins are shown, such as AIDA-I, for example.

However, the prior art contains no experimental proof of the fact that AIDA-I protein may actually be suitable as an autotransporter and in particular as an autotransporter for the surface presentation of recombinant passenger domains.



The present international application has now been able to demonstrate that the AIDA-I protein is actually an autotransporter and that, as concerns export efficiency, the transporting properties of the AIDA-I protein are superior to those of the IgA- β -transport domains used hitherto in the prior art. A further advantage of the AIDA-I transporter is that it has far greater compatibility with a homologous *E. coli* host cell than the IgA- β -transport domains from *N. gonorrhoeae*. This advantage of greater compatibility is achieved when the host bacterium is homologous to the nucleic acid section coding for the transporter domain.

Therefore an inventive step can be recognized in claims 1 to 38 of the present international application (PCT Article 33(3)).



VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. As concerns claims 1, 9, 20, 32 to 34 and 36 it should be noted that the terms "optionally" and "in particular" used in the claims do not restrict the scope of protection claimed, that is, the feature following such an expression is entirely optional.



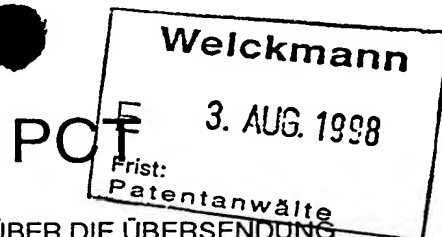
VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

4

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

WEICKMANN WEICKMANN PRECHTEL WEISS
TIESMEYER HERZOG BÖHM LISKA & HUBER
Kopernikusstrasse 9
D-81679 München
ALLEMAGNE



MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNGSBERICHTS
(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr)

30. 07. 98

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts
13834P WO

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP96/01130

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)
15/03/1996

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
15/03/1996

Anmelder

MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG... et al

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde

 Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d
Fax: (+49-89) 2399-4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Heisel, M

Tel. (+49-89) 2399-8051





VERTRAG ÜBER INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 13834P WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP96/01130	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 15/03/1996	Priority date (Tag/Monat/Jahr) 15/03/1996
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/62		
Anmelder MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FOERDERUNG... et al		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.



2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

- ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 5. Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 05/05/1997	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 30.07.98
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Bevollmächtigter Bediensteter Donath, C Telefon (+49-89) 2399-8710 



I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-39 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-19 ursprüngliche Fassung

20-38 eingegangen am 06/07/1998 mit Schreiben vom 06/07/1998

Zeichnungen, Blätter:

1/28-28/28 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:



INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP96/01130

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-38
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-38
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-38
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt



-Ad Sektion V.:

1. Die vorliegende Internationale Anmeldung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von stabilen Fusionsproteinen bestehend aus einem Trägerprotein und einem Passagierprotein, wobei die Expression der Fusionsproteine zur Exposition der Passagierdomänen auf der Oberfläche von Gram-negativen Wirtsbakterienzellen führt. Desweiteren betrifft die vorliegende Internationale Anmeldung Vektoren sowie Wirt-Vektorkombinationen zur Verwendung in dem oben benannten Verfahren.

Im Hinblick auf die im Internationalen Recherchenbericht zitierten Dokumente müssen die Ansprüche 1 -38 der vorliegenden Internationalen Anmeldung als neu betrachtet werden (Artikel 33(2) PCT).

2. Zur Beurteilung eines erfinderischen Schrittes der Ansprüche 1 -38 der vorliegenden Internationalen Anmeldung wird das Dokument D1 (WO-A-95/17509) als nächstliegender Stand der Technik herangezogen.
D1 beschreibt ein Verfahren zur Präsentation von Peptiden oder Polypeptiden auf der Oberfläche von Gram-negativen Wirtsbakterien sowie ein Verfahren zur Herstellung einer varianten Population von oberflächenexponierten Peptiden oder Polypeptiden. Diese Verfahren umfassen folgende Schritte:
 - a) Herstellung von Fusionsgenen durch Klonierung der kodierenden Sequenz eines gewünschten Passagiers (Antigen-bindende Domäne eines Antikörpers, ein Antigen, ein Rezeptor, ein Ligand, ein Nukleinsäure-bindendes Protein, ein Inhibitor oder ein Protein mit enzymatischer Aktivität) in frame mit der kodierenden Sequenz der Transportdomäne eines Autotransporters (IgA- β -Transportdomäne) und eines Signalpeptides in mindestens einen Vektor;
 - b) Variieren des Passagierpeptids bzw. Polypeptids durch Mutagenese;
 - c) Einbringen des/der Vektors/en in Wirtsbakterien (E.coli), die den/die Passagier/e stabil an der Oberfläche präsentieren können;
 - d) Exprimieren des/der Fusionsgens/e in den Wirtsbakterien;
 - e) Kultivieren der Bakterien zur Produktion des/der stabil oberflächenexponiert präsentierten Passagiers/e.

Die Wirtsbakterien, die das/die Fusionsprotein/e stabil auf ihrer Oberfläche präsentieren, können durch Interaktion mit dem an eine Matrix gebundenen Bindungspartner des/der Passagierproteins/e, durch Interaktion mit einem



fluoreszenz-markierten Bindungspartner oder durch Interaktion mit dem an Magnetpartikel gebundenen Bindungspartner des/der Passagierproteins/e isoliert werden (s.D1 S.8, Zeile 14 - S.14, Zeile 28, Beispiele 2 - 5).

Der Gegenstand der Ansprüche 1 -38 unterscheidet sich vom nächstliegenden Stand der Technik dadurch, daß anstelle der IgA- β -Transportdomäne die E.coli AIDA-I Transportdomäne verwendet wird, bzw. daß das Wirtsbakterium gegenüber dem für die Transporterdomäne kodierenden Nukleinsäureabschnitt homolog ist.

Dokument Mol.Microbiol. 18 (1995), 377-382 gibt einen Überblick des bestehenden Standes der Technik betreffend der Herstellung stabiler Fusionsproteine, welche mittels einer Transporterdomäne ein Passagierprotein auf der Oberfläche einer Wirtszelle präsentiert werden können. Verschiedene mutmaßliche bakterielle Autotransporterproteine werden aufgezeigt, wie z.B. AIDA-I.

Im Stand der Technik findet sich jedoch keinerlei experimenteller Beleg dafür, daß das AIDA-I Protein tatsächlich als Autotransporter und insbesondere als Autotransporter für eine Oberflächenpräsentation rekombinanter Passagierdomänen geeignet sein könnte.

In der vorliegenden Internationalen Anmeldung könnte nunmehr gezeigt werden, daß es sich bei dem AIDA-I Protein wirklich um einen Autotransporter handelt und daß die Transporteigenschaften des AIDA-I Proteins denen der bisher im Stand der Technik verwendeten IgA- β -Transportdomäne hinsichtlich der Exporteffizienz überlegen sind. Ein weiterer Vorteil des AIDA-I Transporters besteht darin, daß er mit einer homologen E.coli Wirtszelle eine weitaus höhere Kompatibilität als die IgA- β -Transportdomäne aus N.gonorrhoeae aufweist. Dieser Vorteil einer höheren Kompatibilität wird dann erreicht wenn das Wirtsbakterium gegenüber dem für die Transporterdomäne kodierenden Nukleinsäureabschnitt homolog ist.

Für die Ansprüche 1 -38 der vorliegenden Internationalen Anmeldung ist daher eine erfinderische Tätigkeit anzuerkennen (Artikel 33(3) PCT).

Ad Sektion VIII.:



- 1. Betreffend die Ansprüche 1, 9, 20, 32 -34 und 36 ist anzumerken, daß der in den Ansprüchen verwendete Ausdruck "gegebenenfalls" bzw. "Insbesondere" keine Beschränkung des Schutzzumfanges der Ansprüche bewirkt, d.h. das nach einem derartigen Ausdruck stehende Merkmal ist als ganz und gar fakultativ zu betrachten.



Neue Ansprüche 20 bis 38

20. Verfahren zur Herstellung einer gegebenenfalls varianten
5 Population von oberflächenexponierten Peptiden oder Poly-
peptiden und zur Identifizierung der Bakterien, die Pep-
tide bzw. Polypeptide mit einer jeweils gewünschten Ei-
genschaft tragen, wobei das Verfahren folgende Schritte
umfaßt:
- 10
- (1) Herstellen eines oder mehrerer Fusionsgene durch
Klonierung der kodierenden Sequenz eines gewünschten
Passagiers in frame mit der kodierenden Sequenz der
Transporterdomäne des AIDA-Proteins aus E.coli oder
15 einer Variante davon und eines Signalpeptides in
mindestens einen Vektor;
 - (2) gegebenenfalls Variieren des Passagierpeptids bzw.
-polypeptids durch Mutagenese;

20

 - (3) Einbringen des Vektors oder der Vektoren in Wirts-
bakterien, die den Passagier oder die Passagiere
stabil an der Oberfläche präsentieren können,

25

 - (4) Exprimieren des Fusionsgens bzw. der Fusionsgene in
den Wirtsbakterien;
 - (5) Kultivieren der Bakterien zur Produktion des stabil
oberflächenexponiert präsentierten Passagiers oder
30 der stabil oberflächenexponiert präsentierten Pas-
sagiere;
 - (6) gegebenenfalls Selektionieren der Bakterien, die den
Passagier oder die Passagiere mit den gewünschten
35 Eigenschaften auf der Oberfläche tragen, und
 - (7) gegebenenfalls Charakterisieren eines Bindungspart-



ners für den Passagier mit den optimalen Eigenschaften.

21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei das Verfahren mehrmals
5 durchlaufen wird.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 - 21, wobei das im
Fusionsprotein enthaltene Passagierprotein ein Peptid
oder Polypeptid mit einer Affinität zu einem Bindungs-
10 partner, ein Ligand, ein Rezeptor, ein Antigen, ein To-
xin-bindendes Protein, ein Protein mit enzymatischer
Aktivität, ein Nukleinsäure-bindendes Protein, ein Inhi-
bitor, ein Chelator-Eigenschaften habendes Protein, ein
Antikörper oder eine Antigen-bindende Domäne eines Anti-
15 körpers ist.
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 - 22, wobei die
Identifizierung des Bakteriums, das einen Passagier mit
einer gewünschten Bindungsaffinität oberflächenexponiert
20 präsentiert, durch Bindung an einen immobilisierten
oder/und markierten Bindungspartner erfolgt.
24. Verfahren nach Anspruch 20, wobei der Bindungspartner so
modifiziert ist, daß er in einem zweiten Schritt durch
25 einen für die Modifikation spezifischen Bindungspartner
detektiert werden kann.
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 24,
dadurch gekennzeichnet,
30 daß Passagierproteine oder Teile davon auf der Bakte-
rienoberfläche chemisch oder enzymatisch modifiziert
werden.
26. Verfahren nach Anspruch 25,
35 dadurch gekennzeichnet,
daß die Modifikation eine nicht-kovalente Modifikation
ist.



27. Verfahren nach Anspruch 25,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Modifikation eine kovalente Modifikation ist.
- 5 28. Verfahren nach Anspruch 27,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Modifikation eine Glykosylierung ist.
29. Verfahren nach Anspruch 27,
10 dadurch gekennzeichnet,
daß die Modifikation eine Phosphorylierung ist.
30. Verfahren nach Anspruch 25,
dadurch gekennzeichnet,
15 daß die Modifikation eine Proteolyse ist.
31. Verfahren nach Anspruch 30,
dadurch gekennzeichnet,
daß Passagierproteine oder Teile davon durch intrinsische
20 oder extern zugeführte Proteasen selektiv von der Bakte-
rienoberfläche freigesetzt werden.
32. Verfahren nach Anspruch 31,
dadurch gekennzeichnet,
25 daß Passagierproteine oder Teile davon durch eine in-
trinsische Protease der Wirtszelle, insbesondere die
OmpT-Protease, die OmpK-Protease oder die Protease X,
freigesetzt werden.
- 30 33. Verfahren nach Anspruch 32,
dadurch gekennzeichnet,
daß Passagierproteine oder Teile davon durch eine extern
zugeführte Protease, insbesondere die IgA-Protease,
Thrombin oder Faktor X, freigesetzt werden.



34. Rekombinanter Vektor auf dem in operativer Verknüpfung mit einem Promotor eine fusionierte Nukleinsäuresequenz lokalisiert ist, umfassend:

- (i) einen Signalpeptid-kodierenden Nukleinsäureabschnitt,
- (ii) einen für das zu präsentierende Passagierpeptid oder/und Passagierpolypeptid kodierenden Nukleinsäureabschnitt,
- (iii) gegebenenfalls einen für eine Proteaseerkennungsstelle kodierenden Nukleinsäureabschnitt,
- (iv) einen für einen Transmembranlinker kodierenden Nukleinsäureabschnitt und
- (v) einen für die Transporterdomäne des AIDA-Proteins aus E.coli oder eine Variante davon kodierenden Nukleinsäureabschnitt;

wobei der Nukleinsäureabschnitt (ii) gegenüber dem für die Transporterdomäne (v) kodierenden Nukleinsäureabschnitt heterolog ist.

35. Rekombinantes Gram-negatives Wirtsbakterium, dadurch gekennzeichnet, daß es mit einem Vektor nach Anspruch 34 transformiert ist.

36. Rekombinantes Gram-negatives Wirtsbakterium, das transformiert ist mit einem rekombinanten Vektor auf dem in operativer Verknüpfung mit einem Promotor eine fusionierte Nukleinsäuresequenz lokalisiert ist, umfassend:

- (i) einen Signalpeptid-kodierenden Nukleinsäureabschnitt,
- (ii) einen für das zu präsentierende Passagierpeptid oder/und Passagierpolypeptid kodierenden Nukleinsäureabschnitt,
- (iii) gegebenenfalls einen für eine Proteaseerkennungsstelle kodierenden Nukleinsäureabschnitt,



- (iv) einen für einen Transmembranlinker kodierenden Nukleinsäureabschnitt und
- (v) einen für eine Transporterdomäne eines Autotransporters kodierenden Nukleinsäureabschnitt;

5

wobei der Nukleinsäureabschnitt (ii) gegenüber dem für die Transporterdomäne (v) kodierenden Nukleinsäureabschnitt heterolog ist und wobei das Wirtsbakterium gegenüber dem für die Transporterdomäne (v) kodierenden Nukleinsäureabschnitt homolog ist.

10

- 37. Wirtsbakterium nach Anspruch 36,
dadurch gekennzeichnet,
daß es eine E.coli Zelle ist.

15

- 38. Wirtsbakterium nach einem der Ansprüche 36 - 37,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Nukleinsäureabschnitt (v) für die Transporterdomäne des AIDA-Proteins oder eine Variante davon kodiert.

20

/home/vo/anm/13834anrpneu 03.07.1998



1

PC

ANTRAG

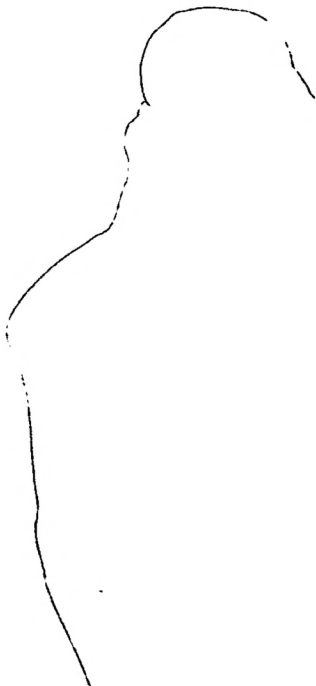
Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Anmelderamt auszufüllen	
PCT/EP 95 / 0 1 1 3 0	
Internationales Aktenzeichen	
15 MAR 1996	(15. 03. 96)
Internationales Anmeldedatum	
EUROPEAN PATENT OFFICE PCT INTERNATIONAL APPLICATION Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"	
Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht) (max. 12 Zeichen)	
13834P WO	

Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG	
Exportsysteme für rekombinante Proteine	
Feld Nr. II ANMELDER	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)	
Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V., Berlin, DE Verwaltungsanschrift: Hofgartenstraße 2, D-80539 München DE	
<input type="checkbox"/> Diese Person ist gleichzeitig Erfinder	
Telefonnr.:	
Telefaxnr.:	
Fernschreibnr.:	
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input checked="" type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten	
Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)	
MAURER, Jochen Pfleghofstraße 10 D-72070 Tübingen DE	
Diese Person ist: <input type="checkbox"/> nur Anmelder <input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder <input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)	
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.	
Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ZUSTELLANSCHRIFT	
Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln: <input checked="" type="checkbox"/> Anwalt <input type="checkbox"/> gemeinsamer Vertreter	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)	
Telefonnr.: 089 / 4 55 63 - 0	
Telefaxnr.: 089 / 4 70 50 68	
Fernschreibnr.: 5 22 621 wepat d	
<input type="checkbox"/> Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.	



Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER			
<i>Wird keines der folgenden Felder benutzt, so ist dieses Blatt dem Antrag nicht beizufügen.</i>			
Name und Anschrift: <i>(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben)</i> JOSE, Joachim Hartmeyerstraße 48 D-72076 Tübingen DE		Diese Person ist: <input type="checkbox"/> nur Anmelder <input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder <input type="checkbox"/> nur Erfinder <i>(Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</i>	
Staatsangehörigkeit (Staat): DE		Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten			
Name und Anschrift: <i>(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben)</i> MEYER, Thomas F. Spemannstraße 30 D-72076 Tübingen DE		Diese Person ist: <input type="checkbox"/> nur Anmelder <input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder <input type="checkbox"/> nur Erfinder <i>(Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</i>	
Staatsangehörigkeit (Staat): DE		Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten			
Name und Anschrift: <i>(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben)</i> 		Diese Person ist: <input type="checkbox"/> nur Anmelder <input type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder <input type="checkbox"/> nur Erfinder <i>(Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</i>	
Staatsangehörigkeit (Staat):		Sitz oder Wohnsitz (Staat):	
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten			
Name und Anschrift: <i>(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben)</i> 		Diese Person ist: <input type="checkbox"/> nur Anmelder <input type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder <input type="checkbox"/> nur Erfinder <i>(Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</i>	
Staatsangehörigkeit (Staat):		Sitz oder Wohnsitz (Staat):	
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten			
Name und Anschrift: <i>(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben)</i> 		Diese Person ist: <input type="checkbox"/> nur Anmelder <input type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder <input type="checkbox"/> nur Erfinder <i>(Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</i>	
Staatsangehörigkeit (Staat):		Sitz oder Wohnsitz (Staat):	
Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten			
<input type="checkbox"/> Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.			



Feld Nr. V BESTIMMUNG VON PATENTEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

- ☐ AP ARIPO-Patent: KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swasiland, UG Uganda und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☐ EA Eurasisches Patent: AZ Aserbaidschan, BY Belarus, KZ Kasachstan, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ EP Europäisches Patent: AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☐ OA OAPI-Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> AL Albanien | <input type="checkbox"/> MD Republik Moldau |
| <input type="checkbox"/> AM Armenien | <input type="checkbox"/> MG Madagaskar |
| <input type="checkbox"/> AT Österreich | <input type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Volksrepublik Mazedonien |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australien | <input type="checkbox"/> MN Mongolei |
| <input type="checkbox"/> AZ Aserbaidschan | <input type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados | <input type="checkbox"/> MX Mexiko |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgarien | <input type="checkbox"/> NO Norwegen |
| <input type="checkbox"/> BR Brasilien | <input checked="" type="checkbox"/> NZ Neuseeland |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus | <input type="checkbox"/> PL Polen |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada | <input type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein | <input type="checkbox"/> RO Rumänien |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input type="checkbox"/> RU Russische Föderation |
| <input type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik | <input type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input type="checkbox"/> DE Deutschland | <input type="checkbox"/> SE Schweden |
| <input type="checkbox"/> DK Dänemark | <input type="checkbox"/> SG Singapur |
| <input type="checkbox"/> EE Estland | <input type="checkbox"/> SI Slowenien |
| <input type="checkbox"/> ES Spanien | <input type="checkbox"/> SK Slowakei |
| <input type="checkbox"/> FI Finnland | <input type="checkbox"/> TJ Tadschikistan |
| <input type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> GE Georgien | <input type="checkbox"/> TR Türkei |
| <input type="checkbox"/> HU Ungarn | <input type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago |
| <input type="checkbox"/> IS Island | <input type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input type="checkbox"/> KE Kenia | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika |
| <input type="checkbox"/> KG Kirgisistan | <input type="checkbox"/> UZ Usbekistan |
| <input type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | <input type="checkbox"/> VN Vietnam |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republik Korea | |
| <input type="checkbox"/> KZ Kasachstan | |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |
| <input type="checkbox"/> LR Liberia | |
| <input type="checkbox"/> LS Lesotho | |
| <input type="checkbox"/> LT Litauen | |
| <input type="checkbox"/> LU Luxemburg | |
| <input type="checkbox"/> LV Lettland | |

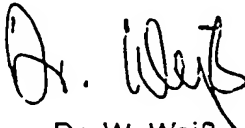
Kästchen für die Bestimmung von Staaten (für die Zwecke eines nationalen Patents), die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigegeben sind:

- ☐
- ☐
- ☐
- ☐

Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der Bestimmung von

Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühren. Die Bestätigung muß beim Anmeldedatum innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehten.)



Feld Nr. VI PRIORITÄTS...		Weitere Prioritäts... sind im Zusatzfeld angegeben. <input type="checkbox"/>	
Die Priorität der folgenden früheren Anmeldung(en) wird hiermit beansprucht:			
Staat (Anmelde- oder Bestimmungsstaat der Anmeldung)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen	Anmeldeamt (nur bei regionaler oder internationaler Anmeldung)
(1)			
(2)			
(3)			
<p>Dieses Kästchen ankreuzen, wenn die beglaubigte Kopie der früheren Anmeldung von dem Amt ausgestellt werden soll, das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist (eine Gebühr kann verlangt werden):</p> <p><input type="checkbox"/> Das Anmeldeamt wird hiermit ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in Zeile(n) ... bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem Internationalen Büro zu übermitteln.</p>			
Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE			
<p>Wahl der Internationalen Recherchenbehörde (ISA) (Sind zwei oder mehr Internationale Recherchenbehörden für die internationale Recherche zuständig, ist der Name der Behörde anzugeben, die die internationale Recherche durchführen soll; Zweibuchstaben-Code genügt): <u>ISA / EPA</u></p> <p>Frühere Recherche: Auszufüllen, wenn eine Recherche (internationale Recherche, Recherche internationaler Art oder sonstige Recherche) bereits bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist und diese Behörde nun ersucht wird, die internationale Recherche soweit wie möglich auf die Ergebnisse einer solchen früheren Recherche zu stützen. Die Recherche oder der Recherchenantrag ist durch Angabe der betreffenden Anmeldung (bzw. deren Übersetzung) oder des Recherchenantrags zu bezeichnen.</p> <p>Staat (oder regionales Amt): _____ Datum (Tag/Monat/Jahr): _____ Aktenzeichen: _____</p>			
Feld Nr. VIII KONTROLLISTE			
<p>Diese internationale Anmeldung umfaßt:</p> <p>1. Antrag : 4 Blätter</p> <p>2. Beschreibung : 39 Blätter</p> <p>3. Ansprüche : 8 Blätter</p> <p>4. Zusammenfassung : 1 Blätter</p> <p>5. Zeichnungen : 28 Blätter</p> <p>Insgesamt : 80 Blätter</p>		<p>Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Unterzeichnete gesonderte Vollmacht</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen der Unterschrift</p> <p>4. <input type="checkbox"/> Prioritätsbeleg(e) (durch die Zeilennummer von Feld Nr. VI kennzeichnen):</p> <p>5. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung</p> <p>6. <input type="checkbox"/> Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen</p> <p>7. <input type="checkbox"/> Sequenzprotokolle für Nucleotide und/oder Aminosäuren (Diskette)</p> <p>8. <input type="checkbox"/> Sonstige (einzeln auflisten):</p>	
Abbildung Nr. _____ der Zeichnungen (falls vorhanden) soll mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden.			
Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS			
<p>Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.</p> <p style="text-align: center;">  Dr. W. Weiß </p> <p style="text-align: right;">15. März 1996</p>			

Vom Anmeldeamt auszufüllen	
1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung: <u>15 MAR 1996</u>	2. Zeichnungen <input checked="" type="checkbox"/> eingegangen: <u>15.03.1996</u>
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:	2. Zeichnungen <input type="checkbox"/> nicht eingegangen:
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:	
5. Vom Anmelder benannte Internationale Recherchenbehörde: <u>ISA /</u>	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben

Vom Internationalen Büro auszufüllen	
Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:	



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTRECHTS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 13834P WO	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 96/ 01130	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 15/03/1996	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
Anmelder MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT... et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).
2. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).
3. ☐ In der internationalen Anmeldung ist ein Protokoll einer Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz offenbart; die internationale Recherche wurde auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt,
 - ☐ das zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht wurde.
 - ☐ das vom Anmelder getrennt von der internationalen Anmeldung vorgelegt wurde,
 - ☐ dem jedoch keine Erklärung beigefügt war, daß der Inhalt des Protokolls nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung hinausgeht.
 - ☐ das von der Internationalen Recherchenbehörde in die ordnungsgemäße Form übertragen wurde.
4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung
 - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
 - ☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt.
5. Hinsichtlich der Zusammenfassung
 - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
 - ☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der Feld III angegebenen Fassung von dieser Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Internationalen Recherchenbehörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.
6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen:

Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen
 ☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
 ☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.



A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/62 C12N15/65 C12N15/70 C07K16/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 95 17509 A (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.) 29.Juni 1995	21,36,37
Y	siehe Seite 8, Zeile 1 - Seite 9, Zeile 25 siehe Seite 10, Zeile 26 - Seite 13, Zeile 30; Beispiele 2-5 --- -/--	1-25, 38-40



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

27.März 1997

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

7.04.97

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Donath, C



C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	VACCINE, Bd. 12, Nr. 6, Mai 1994, Seiten 492-498, XP000651455 RUPPERT, A. ET AL.: "OmpA-FMDV VP1 fusion proteins: production, cell surface exposure and immune responses to the major antigenic domain of foot-and-mouth disease virus"	21,36,37
Y	siehe das ganze Dokument	1,2,9, 10,15, 16,38

X	EMBO J., Bd. 11, Nr. 6, 1992, Seiten 2327-2335, XP002028468 KLAUSER, T. ET AL.: "Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by Escherichia coli: dissection of Neisseria IgaA-mediated outer membrane transport"	21,36,37
	siehe das ganze Dokument	

Y	MOLECULAR MICROBIOLOGY, Bd. 18, Nr. 2, 1995, Seiten 377-382, XP000651438 JOSE, J. ET AL.: "MicroCorrespondence: Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters"	1-3, 5-10, 20-23, 38-40
	siehe Seite 378 - Seite 380	

Y	WO 93 10214 A (GEORGIU, G.) 27.Mai 1993 siehe Seite 6, Zeile 6 - Seite 10, Zeile 28 siehe Seite 12, Zeile 4 - Seite 13, Zeile 29	1-25

Y	BIO-TECHNOLOGY, Bd. 14, Nr. 2, Februar 1996, Seiten 203-208, XP002028469 CORNELIS, P. ET AL.: "Development of new cloning vectors for the production of immunogenic outer membrane fusion proteins in Escherichia coli"	1,2,9-11
	siehe das ganze Dokument	

Y	MOLECULAR MICROBIOLOGY, Bd. 17, Nr. 1, 1995, Seiten 123-135, XP000651454 BENJELLOUN-TOUIMI, Z. ET AL.: "SepA, the major extracellular protein of Shigella flexneri: autonomous secretion and involvement in tissue invasion"	2,4
	siehe das ganze Dokument	

	-/--	



C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESCHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
T	J.BACTERIOLOGY, Bd. 179, Nr. 3, Februar 1997, Seiten 794-804, XP000651378 MAURER, J. ET AL.: "Autodisplay: One-Component System for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from Escherichia coli" siehe das ganze Dokument -----	1-38



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

EP 96/01130

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9517509 A	29-06-95	DE 4344350 A	29-06-95
		EP 0731837 A	18-09-96

WO 9310214 A	27-05-93	US 5348867 A	20-09-94
		CA 2123676 A	27-05-93
		EP 0746621 A	11-12-96



PCT

ORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C12N 15/62, 15/65, 15/70, C07K 16/00		A1	(11) Internatn ale Veröffentlichungsnummer: WO 97/35022
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 25. September 1997 (25.09.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: ✓ PCT/EP96/01130		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, JP, KR, NZ, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: ✓ 15. März 1996 (15.03.96) <i>15 Sep 98</i>			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX- PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V., BERLIN [DE/DE]; Verwal- tungsanschrift, Hofgartenstrasse 2, D-80539 München (DE).		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MAURER, Jochen [DE/DE]; Pfleghofstrasse 10, D-72070 Tübingen (DE); JOSE, Joachim [DE/DE]; Hartmeyerstrasse 48, D-72076 Tübingen (DE). ✓ MEYER, Thomas, F. [DE/DE]; Spemannstrasse 30, D- 72076 Tübingen (DE).			
(74) Anwälte: WEICKMANN, H., usw.; Kopernikusstrasse 9, D- 81679 München (DE).			
(54) Title: EXPORT SYSTEMS FOR RECOMBINANT PROTEINS ✓			
(54) Bezeichnung: EXPORTSYSTEME FÜR REKOMBINANTE PROTEINE			
(57) Abstract The present invention relates to vectors, host-vector combinations and processes for producing stable fusion proteins consisting of a carrier protein and a passenger protein. Expression of the fusion protein results in exposure of the passenger domains on the surface of bacterial cells, in particular <i>Escherichia coli</i> . If necessary, the passenger domains can be released into the medium by proteases, e.g. by selected host factors such as OmpT.			
(57) Zusammenfassung Die vorliegende Erfindung betrifft Vektoren, Wirt-Vektorkombinationen und Verfahren zur Herstellung von stabilen Fusionsproteinen bestehend aus einem Trägerprotein und einem Passagierprotein, wobei die Expression der Fusionsproteine zur Exposition der Passagierdomänen auf der Oberfläche von Bakterienzellen, insbesondere <i>Escherichia coli</i> Zellen führt. Bei Bedarf können die Passagierdomänen durch Proteasen, z.B. durch ausgewählte Wirtsfaktoren, wie etwa OmpT in das Milieu freigesetzt werden.			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshjan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	R	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Exportsysteme für rekombinante Proteine

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft Vektoren, Wirt-Vektorkombinationen und Verfahren zur Herstellung von stabilen Fusionsproteinen bestehend aus einem Trägerprotein und einem Passagierprotein, wobei die Expression der Fusionsproteine zur Exposition der Passagierdomänen auf der Oberfläche von Bakterienzellen, insbesondere Escherichia coli Zellen führt. Bei Bedarf können die Passagierdomänen durch Proteasen, z.B. durch ausgewählte Wirtsfaktoren, wie etwa OmpT in das Milieu freigesetzt werden.

15

Die vorliegende Erfindung betrifft darüberhinaus die Verwendung von Trägerproteinen oder Trägerproteinanteilen aus natürlichen Proteinen, die als Aminosäuresequenzen in Datenbanken oder Dateien vorliegen und entsprechend ihrer Eigenschaften Autotransporter genannt werden.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht Verfahren zur Identifizierung und Selektion von Bakterien, die mindestens ein Passagierprotein auf ihrer Oberfläche mit definierter Affinität zu einem Bindungspartner exprimieren, sowie deren Verwendung für diagnostische Zwecke. Insbesondere erlaubt das erfindungsgemäße Verfahren die Expression von Peptid-Bibliotheken auf der Oberfläche von Bakterienzellen, mit deren Hilfe beispielsweise die Bestimmung des Liganden mit der höchsten Affinität bei Antikörpern, MHC-Molekülen oder anderen Komponenten des Immunsystems möglich ist.

Darüberhinaus ermöglicht das erfindungsgemäße Verfahren die Produktion von Fusionsproteinen, die sich aus Anteilen schwerer und leichter Antikörperdomänen und einem Autotransporter zusammensetzen, und deren Transport durch die bakterielle Zellhülle. In einer spezifischen Ausführungsform wird letzt-

lich die zielgerichtete Varianz von bindungsaktiven rekombinanten Antikörpern und deren funktionelle Präsentation auf der Zelloberfläche von Escherichia coli möglich.

5 Generell erlaubt das erfindungsgemäße Verfahren die Expression von rekombinanten Proteinen, die Rezeptoren oder Liganden sein können, auf der Bakterienoberfläche, sowie die Selektion aufgrund der Bindungsaffinität zu einem Bindungspartner, womit eine damit einhergehende Selektion eines klonalen
10 Produzenten möglich wird.

Erfindungsgemäß ist auch eine Verwendung von Bakterien, die Proteinfusionen auf der Zelloberfläche exprimieren und die gebunden an ein Trägermaterial oder in Lösung vorliegen, zur
15 gezielten Anreicherung oder Reinigung eines zu den Oberflächen-exponierten Proteindomänen Affinität zeigenden Bindungspartners. Darüberhinaus betrifft die vorliegende Erfindung auch die Oberflächenexpression von Enzymen oder anderen Proteinen mit biologisch, chemisch oder technisch relevanten
20 Eigenschaften, sowie, im Bedarfsfalle, deren gezielte Freisetzung in das umgebende Milieu.

Die Oberflächenexposition von rekombinanten Proteinen auf Bakterienzellen ist ein Verfahren mit einer Vielzahl von möglichen mikrobiologischen, molekularbiologischen, immunologischen oder technischen Anwendungen. Durch Produktion von rekombinanten Proteinen auf diese Art und Weise werden ihre Eigenschaften, z.B. Bindungsaffinitäten oder enzymatische Aktivitäten (Francisco et al., Bio.Technology 11 (1993) 491 -
30 495) zugänglich, ohne daß ein weiterer Schritt, wie beispielsweise der Aufschluß der Produzentenzelle notwendig ist. Da nur eine limitierte Anzahl von Faktoren natürlicherweise auf der Bakterienoberfläche exprimiert werden, ist zusätzlich eine spezifische Anreicherung des rekombinanten Proteins im Vergleich zu einer cytosolischen Produktion gegeben.
35 Ein weiterer wesentlicher Vorteil ist, daß man mit den gleichen Methoden, mit denen man das gesuchte rekombinante Pro-

tein selektioniert, auch den Produzenten dieses Proteins, eine Bakterienzelle isolieren kann, und somit einen klonalen Produzenten erhält, der dauerhaft gelagert, stabil reproduziert und in großem Maßstab vermehrt werden kann.

5

Für die Präsentation rekombinanter Proteine auf der Zelloberfläche wurden bisher verschiedene Systeme verwendet, die jedoch ausnahmslos auch natürlicherweise für den Transport oder die Sekretion bakterieller Oberflächenproteine dienen (Little et al., TIBTECH 11 (1993), 3 - 5). Sinnvollerweise wurde dabei die DNA-Region, die natürlicherweise für das zu transportierende Protein, den Passagier, kodiert, ersetzt oder ergänzt durch die kodierende DNA-Region des gewünschten rekombinanten Proteines, wobei jedoch die kodierenden Bereiche der für den Transport verantwortlichen Proteindomänen, die Trägerproteine, in der Regel unverändert blieben. Daraus wird deutlich, daß Systeme, in denen Passagier- und Trägerkomponente unmittelbar benachbart oder in einem Gen kodiert vorliegen, sogenannte Ein-Komponenten-Systeme, einen erheblichen Vorteil gegenüber Systemen mit mehreren, unabhängigen Komponenten (Gentshev et al., Behring Inst. Mitt. 95 (1994) 57 - 66) haben, insbesondere bei der Herstellung von universell verwendbaren Vektoren, die neben der Eigenschaft zur stabilen Replikation, einem oder mehreren Selektionsmarkern, den für den Transport notwendigen Proteindomänen, auch eine Insertionsstelle für das den Passagier kodierende DNA-Fragment enthalten müssen. Als Trägerproteine in vielen bisher verwendeten Ein-Komponenten-Systemen wurden Proteine der äußeren Membran von E. coli verwendet. Dazu gehören unter anderem LamB (Charbit et al., Gene 70 (1988), 181 - 189), PhoE (Agterberg et al., Gene 59 (1987) 145 - 150) oder OmpA (Francisco et al., Proc. Natl. Acad. Sci (1992), 2713 - 2717), deren Verwendung jedoch Nachteile bergen. So können zusätzliche Proteinsequenzen nur in oberflächenexponierten Schleifen integriert werden, was einmal zu fixierten amino- und carboxyterminalen Enden an den einrahmenden Trägerproteinsequenzen führt und zum anderen sich limitierend auf die Länge

der einzubringenden Sequenzen auswirkt. Die Verwendung des Peptidoglykan assoziierten Lipoproteins (PAL) als Trägerprotein führt zwar zum Transport zur äußeren Membran, eine Präsentation nativer Proteinsequenzen auf der Oberfläche von *E. coli* ist damit jedoch nicht möglich (Fuchs et al., Bio.Technology 9 (1991), 1369 - 1372). Eine Oberflächenexpression größerer Proteine ist möglich unter Verwendung einer Fusion aus OmpA und Lpp als Trägerproteinanteil, an deren Carboxylende die Passagierproteinsequenzen angehängt werden (Francisco et al., Proc. Natl. Acad. Sci (1992), 2713 - 2717). Dabei ist als Nachteil in Kauf zu nehmen, daß die Fixierung des N-Terminus des Passagiers eine korrekte Faltung oder Funktion verhindern kann.

Weiterhin sind sogenannte Autotransporter enthaltende Proteine bekannt, eine Familie von sekretierten Proteinen in Gram-negativen Bakterien. In der Publikation Jose et al. (Mol.Microbiol. 18 (1995), 377-382) werden einige Beispiele für solche Autotransporterproteine genannt. Diese Proteine enthalten eine Proteindomäne, die den Transport einer N-terminalen angehängten Proteindomäne durch eine aus β -Faltblattstrukturen gebildete Porenstruktur in der Außenmembran Gram-negativer Bakterien ermöglicht. Die Autotransporter enthaltenden Proteine werden als sogenanntes Poly-Protein-Vorläufermolekül synthetisiert. Der typische Aufbau eines solchen Vorläuferproteins ist dreigeteilt. Am N-Terminus befindet sich eine Signalsequenz, die verantwortlich ist für den Transport durch die innere Membran, unter Inanspruchnahme des im Wirt vorhandenen Sec-Transportapparates und die dabei abgetrennt wird. Daran schließt sich die zu sekretierende Proteindomäne an, gefolgt von einer C-terminalen Helferdomäne, die eine Pore in der Außenmembran bildet, wodurch die N-terminal angehängte zu sekretierende Proteindomäne an die Oberfläche transloziert wird. Dort bleibt diese in Abhängigkeit ihrer auszuübenden Funktion mit dem nun als Membrananker dienenden Helfer an der Bakterienoberfläche verbunden oder wird durch proteolytische Aktivität abgetrennt, wobei diese pro-

teolytische Aktivität der zu sekretierenden Proteindomäne innewohnen kann oder eine vom Wirt ausgehende Eigenschaft sein kann oder eine externe/gezielt zugesetzte Aktivität (z.B. Thrombin, IgA-Protease) sein kann. Die Sekretion heterologer Polypeptide bzw. Proteine unter Verwendung eines auf einem Autotransporter basierenden Expressionssystems ist bekannt. So ist beispielsweise aus EP-A-0 254 090 oder der Publikation Klauser et al. (EMBO J. 11 (1992), 2327-2335) bekannt, daß die Helferdomäne der IgA-Protease aus *N. gonorrhoeae* heterologe Polypeptide als Passagierdomänen in den heterologen Bakterienstämmen *E.coli* und *Salmonella typhimurium* exprimieren kann.

Weiterhin ist der extrazelluläre Transport des Proteins VirG von *Shigella* bei Suzuki et al. (J.Biol.Chem. 270 (1995), 30874-30880) beschrieben. Bei diesem Protein handelt es sich ebenfalls um einen IgA-Protease-ähnlichen Autotransporter, der zur Expression fremder Polypeptide wie etwa MalE und PhoA in der Lage ist, die kovalent an den N-Terminus der Autotransporterdomäne von VirG verknüpft wurden. Weiterhin wird in der Arbeit Shimada et al. (J.Biochem. 116 (1994), 327-334) der extrazelluläre Transport eines heterologen Polypeptids, nämlich Pseudoazurin aus *A. faecales* in *E.coli* unter Verwendung der Autotransporterdomäne der Serinprotease von *S. marcescens* beschrieben.

Bei den im Stand der Technik beschriebenen Verfahren zur Herstellung zur Expression heterologer Passagierproteine mit Hilfe von Autotransportersystemen wurden jedoch erhebliche Nachteile festgestellt. So treten bei Verwendung der Transporter- bzw. Helferdomäne der IgA-Protease aus *N. gonorrhoeae* in *E.coli* als Wirtstamm häufig erhebliche Kompatibilitätsprobleme auf. Zu starke Expression führt zur Zell-Lyse oder die Bakterien zeigen ein vermindertes Wachstum auch bei mittlerer Expression, was in beiden Fällen zu einer erheblich verminderten Fusionsproteinausbeute führt und auf Schwächen in der Stabilität des Systems hinweist. Der vorliegenden Erfindung

lag also das technische Problem zugrunde, Trägerproteine bereitzustellen, die insbesondere bei Verwendung von E.coli als Wirtsstamm nicht zu diesen Nachteilen führen, da aus vielerlei Gründen E.coli als Wirtsstamm gegenüber z.B. Neisseria gonorrhoeae vorzuziehen ist. Zum einen lassen sich E.coli Stämme mit rekombinanter DNA schon in einfachen Laboratorien der Sicherheitsstufe 1 anziehen. Darüberhinaus wird bereits mit E.coli Stämmen in der kommerziellen Produktion rekombinanter Proteine gearbeitet. Dies bedeutet einen erheblichen Vorteil im Umgang und in der Handhabung von rekombinanten E.coli Stämmen im Vergleich zu anderen Wirtsstämmen. Darüberhinaus gibt es von E.coli bereits eine große Anzahl genau charakterisierter Mutantenstämme, die in Abhängigkeit der gewünschten Anwendung eine Auswahl des Wirtsstammes zulassen.

15

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Präsentation von Peptiden oder/und Polypeptiden auf der Oberfläche von Gram-negativen Wirtsbakterien, wobei man,

- 20 (a) ein Wirtsbakterium bereitstellt, das transformiert mit einem Vektor, auf dem in operativer Verknüpfung mit einem Promotor eine fusionierte Nukleinsäuresequenz lokalisiert ist, umfassend:
- (i) einen Signalpeptid-kodierenden Nukleinsäureabschnitt,
 - 25 (ii) einen für das zu präsentierende Passagierpeptid oder/und Passagierpolypeptid kodierenden Nukleinsäureabschnitt,
 - (iii) gegebenenfalls einen für eine Proteaseerkennungsstelle kodierenden Nukleinsäureabschnitt,
 - 30 (iv) einen für einen Transmembranlinker kodierenden Nukleinsäureabschnitt und
 - (v) einen für eine Transporterdomäne eines Autotransporters kodierenden Nukleinsäureabschnitt; und
- 35 (b) das Wirtsbakterium unter Bedingungen kultiviert, bei denen eine Expression der fusionierten Nukleinsäuresequenz und eine Präsentation des von dem Nukleinsäureab-

schnitt (ii) kodierten Peptids oder Polypeptids an der Oberfläche des Wirtsbakteriums erfolgt,

dadurch gekennzeichnet, daß der Nukleinsäureabschnitt (ii) gegenüber dem für die Transporterdomäne (v) kodierenden Nukleinsäureabschnitt heterolog und das Wirtsbakterium gegenüber dem für die Transporterdomäne (v) kodierenden Nukleinsäureabschnitt homolog ist.

Durch die Verwendung eines Wirtsbakteriums, welches gegenüber dem für die Transporterdomäne kodierenden Nukleinsäureabschnitt homolog ist, kann überraschenderweise eine gegenüber dem Stand der Technik deutlich verbesserte Oberflächenpräsentation von Peptiden oder und Polypeptiden, insbesondere auch von kurzen synthetischen Peptiden mit einer Länge von vorzugsweise 4 - 50 Aminosäuren bzw. von eukaryontischen Polypeptiden erreicht werden.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren wird ein Wirtsbakterium bereitgestellt, das mit einem bzw. mit mehreren kompatiblen rekombinanten Vektoren transformiert ist. Ein solcher Vektor enthält in operativer Verknüpfung mit einem Promotor und gegebenenfalls weiteren für die Expression erforderlichen Sequenzen eine fusionierte Nukleinsäuresequenz. Diese fusionierte Nukleinsäuresequenz umfaßt (i) einen Signalpeptid-kodierenden Abschnitt, vorzugsweise einen Abschnitt, der für ein Gram-negatives Signalpeptid kodiert, welches den Durchtritt durch die innere Membran in das Periplasma ermöglicht. Weiterhin umfaßt die fusionierte Nukleinsäuresequenz (ii) einen für das zu präsentierende Passagierpeptid bzw. Polypeptid kodierenden Abschnitt. Gegebenenfalls befindet sich 3'-seitig von diesem Abschnitt (iii) ein für eine Proteaseerkennungsstelle kodierender Nukleinsäureabschnitt. Beispiele für geeignete Proteaseerkennungsstellen sind Erkennungsstellen für intrinsische, d.h. natürlicherweise in der Wirtszelle vorhandene oder extern zugeführte Proteasen. Beispiele für extern zugeführte Proteasen sind die IgA-Protease (vgl. z.B.

EP-A-0 254 090), Thrombin oder Faktor X. Beispiele für intrinsische Proteasen sind OmpT, OmpK oder Protease X. 3'-seitig von diesem Abschnitt befindet sich (iv) ein für einen Transmembranlinker kodierender Nukleinsäureabschnitt, der
5 eine Präsentation des von Abschnitt (iii) kodierten Peptids oder Polypeptids auf der Außenseite der äußeren Membran des Wirtsbakteriums ermöglicht. 3'-seitig dieses Abschnitts ist ein für eine Transporterdomäne eines Autotransporters kodierender Nukleinsäureabschnitt.

10

Besonders bevorzugt werden Transmembranlinkerdomänen verwendet, die homolog bezüglich des Autotransporters sind, d.h. die Transmembranlinkerdomänen werden von Nukleinsäureabschnitten direkt 5'-seitig der Autotransporterdomänen ko-
15 diert. Die Länge der Transmembranlinker ist vorzugsweise 30 - 160 Aminosäuren.

Die Transporterdomäne ist in der Lage, in der Außenmembran des Wirtsbakteriums ein sogenanntes β -Faß auszubilden. Das
20 β -Faß besteht aus einer geraden Anzahl antiparalleler, amphipatischer, β -Faltblätter. Diese Struktur besitzt wie andere Proteine der Außenmembran Gram-negativer Bakterien am C-Terminus eine aromatische Aminosäure wie Phenylalanin oder Tryptophan. Darauf folgen abwechselnd geladene (polare) und un-
25 geladene (hydrophobe) Aminosäuren, eine Struktur, die eine Rolle bei der Faltung mit der Membran zu spielen scheint. Die Anzahl und Lage der amphipatischen, β -Faltblätter lassen sich mit Hilfe eines geeigneten Computerprogrammes identifizieren und mit Hilfe von Analogien zu den Außenmembranporinen, von
30 denen die Kristallstruktur bekannt ist (Cowan et al., Nature 358 (1992) 727 - 733), zur Konstruktion eines Modells der Faßstruktur verwenden. Vorzugsweise ist die Faßstruktur aufgebaut wie folgt: 9-14, insbesondere ca. 12 Aminosäuren (AS) für einen Membrandurchgang; keine oder eine minimale Anzahl
35 geladener AS zeigen in einem β -Faltblatt nach außen; kleine oder gar keine Schleifen zeigen nach innen, gegebenenfalls zeigen große oder sehr große Schleifen nach außen; das β -Faß

setzt sich aus 12, 14, 16 oder 18, insbesondere aus 14 anti-
parallelen β -Faltblättern zusammen.

Ausgehend von dem Modell des Fasses kann nun der für den
5 Selbsttransport durch die Außenmembran notwendige Bereich
festgelegt werden und mit einem Signalpeptid und einer Passa-
gierdomäne auf genetischer Ebene verknüpft werden. Die
Expression dieses Konstruktes ermöglicht dann den Transport
des Passagierproteins zur Bakterienoberfläche, wobei das Si-
10 gnalpeptid ursprünglich von dem Passagier oder einem anderen
Protein stammen kann. Dabei muß berücksichtigt werden, daß
zugehörig zu dem β -Faß eine in der Länge und Sequenz geeig-
nete Linkerregion mit verknüpft wird, die durch die gebildete
Pore durchreicht und dafür sorgt, daß die Passagierdomänen
15 vollständig an der Oberfläche exponiert sind.

Ein wesentliches Merkmal des erfindungsgemäßen Verfahrens
ist, daß das Wirtsbakterium gegenüber dem für die Transpor-
terdomäne kodierenden Nukleinsäureabschnitt homolog ist, d.h.
20 die Wirtszelle und die Transporterdomäne werden aus homologen
Familien, z.B. Enterobakterien, vorzugsweise aus homologen
Gattungen, z.B. Escherichia, Salmonella oder Helicobacter, ..
besonders bevorzugt aus homologen Spezies, z.B. Escherichia
coli, Salmonella typhimurium ausgewählt. Besonders bevorzugt
25 werden Salmonella oder E.coli als Wirtsbakterium und eine
ebenfalls aus Salmonella oder E.coli stammende Transporterdo-
mäne oder eine Variante davon verwendet.

Als besonders geeigneter E.coli Wirtsstamm sei hier der Stamm
30 JK321 (DSM 8860) genannt, der $ompT^+$, $dsbA^-$ ist und den gene-
tischen Marker fpt trägt, was zu einer stabilen Oberflächen-
expression auch großer Proteine, wie z.B. der V_h -Kette eines
Antikörpers mit Hilfe des $iga\beta$ -Helferproteins führt.

35 In einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende
Erfindung daher ein Trägerprotein, das eine Autotransporter-
funktion ausübt, und eine Oberflächenexposition von rekombi-

nanten Proteine in *Escherichia coli* mit hoher Ausbeute ermöglicht. In einem typischen Beispiel handelt es sich dabei um den Autotransporter des "adhesin-involved-in-diffuse-adherence" (AIDA-I) aus *E.coli* (Benz und Schmidt, *Infect. Immun.* 57
5 (1989), 1506 - 1511). Die Transporterdomäne des AIDA-I-Proteins ist in Fig. 2 dargestellt. Neben dieser spezifischen Sequenz können auch Varianten davon verwendet werden, die beispielsweise durch Veränderung der Aminosäuresequenz in den nicht am Membrandurchgang beteiligten Schleifenstrukturen
10 erzeugt werden können. Gegebenenfalls können die für die Oberflächenschleifen kodierenden Nukleinsäureabschnitte auch vollständig deletiert werden.

Auch innerhalb der amphipatischen β -Faltblattstrukturen können konservative Aminosäureaustausche, d.h. der Austausch einer hydrophilen durch eine andere hydrophile Aminosäure oder/und der Austausch einer hydrophoben durch eine andere hydrophobe Aminosäure vorgenommen werden. Vorzugsweise hat eine Variante eine Homologie von mindestens 80 % und insbesondere mindestens 90 % zu der in Fig. 2 angegebenen Sequenz der AIDA-I Autotransporterdomäne zumindest im Bereich der β -Faltblattstrukturen.
20

In einem weiteren typischen Beispiel handelt es sich bei dem verwendeten Autotransporter um den des SepA-Proteins aus *Shigella flexneri* (Benjellou-Touimi et al., *Mol. Microbiol.* 17
25 (1995) 123 - 135) oder eine Variante davon. In einem weiteren typischen Beispiel handelt es sich um den Autotransporter des IcsA-Proteins aus *Shigella flexneri* (Goldberg et al., *J. Bacteriol.* 175 (1993), 2189-2196) oder des Tsh-Proteins aus *E.coli* (Provence et al., *Infect. Immun.* 62 (1994), 1369-1380). In einem weiteren typischen Beispiel handelt es sich um den Autotransporter des Hsr-Proteins aus *Helicobacter mustelae* (O'Toole et al., *Mol. Microbiol.* 11 (1994), 349-361), des
30 Prn-Proteins aus *Bordetella ssp.* (Charles et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989), 3554-3558; Li et al., *J. Gen. Microbiol.* 138 (1992), 1697-1705), des Ssp-Proteins aus *Serratia*

marcescens (z.B. Yanagida et al., J.Bacteriol. 166 (1986), 937-944 oder Genbank-Accessionnr. X59719, D78380), des Hap-Proteins aus Haemophilus influenzae (StGeme et al., Mol. Microbiol. 14 (1994), 217-233), des BrkA-Proteins aus Bordetella pertussis (Fernandez und Weiss, Infect.Immunol. 62 (1994), 4727-4738), des VacA-Proteins aus Helicobacter pylori (Schmitt und Haas, Mol.Microbiol. 12 (1994), 307-319) oder verschiedener Proteine aus Rickettsien (z.B. 190kDa Zelloberflächenantigene, Genbank-Accessionnr. M31227; SpaP, Carl et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 87 (1990), 8237-8241; rOmpB, Gilmore et al., Mol.Microbiol. 5 (1991), 2361-2370 und Slp T, Hahn et al., Gene 133 (1993), 129-133) bzw. eine - wie vorstehend definierte - Variante davon.

- 15 Die DNA-Sequenzen und die davon abgeleiteten Aminosäuresequenzen der zuvor genannten Autotransporter sind in den Figuren 7-24 dargestellt.

Weitere Autotransporterdomänen in bakteriellen Oberflächenproteinen oder in sekretierten bakteriellen Proteinen können aus in Datenbanken vorliegenden Proteinsequenzen aus in Proteinsequenzen, die auf in Datenbanken verfügbaren DNA-Sequenzen basieren, oder aus durch Sequenzanalyse direkt oder indirekt über die DNA-Sequenz bestimmten Proteinsequenzen abgeleitet werden. Die entsprechenden kodierenden Regionen (Gene) können zur Herstellung von Vektoren oder Fusionsproteingenen, die eine effektive Oberflächenexpression von Passagierproteinen in Gram-negativen Bakterien, insbesondere E.coli ermöglichen, verwendet werden.

30 Oberflächenpräsentation bzw. -exposition bedeutet erfindungsgemäß, daß die Fusionsproteine bzw. Passagierdomänen auf der dem Medium zugewandten Seite der äußeren Bakterienmembran lokalisiert sind. Oberflächenexponierte Passagierproteine sind in intakten Gram-negativen Bakterien frei zugänglich für Bindungspartner.

In einer bevorzugten Ausführungsform ermöglicht die vorliegende Erfindung also die Oberflächenpräsentation von Peptiden oder in einer weiteren Ausführungsform die Oberflächenpräsentation von Peptidbibliotheken in Gram-negativen Bakterien, insbesondere in E.coli und deren Verwendung zur Bestimmung der Affinität zu einem Antikörper oder einem anderen Rezeptor bzw. zur Epitopkartierung. Epitopkartierung bedeutet, daß das Peptid mit der höchsten Affinität zu einem Antikörper oder einem anderen Rezeptor oberflächenexponiert auf dem produzierenden Stamm identifiziert wird. Dabei wird ein entscheidender Vorteil der vorliegenden Erfindung gegenüber den bisher verwendeten Phagensystemen (Makowski, Gene 128 (1993), 5 - 11) zur Expression von Peptidbibliotheken deutlich. In dem erfindungsgemäßen bakteriellen System erfolgt mit der Identifizierung eines die gewünschten Eigenschaften tragenden Peptides gleichzeitig die Selektion des klonalen Produzenten. Dieser kann unmittelbar vermehrt werden und zur Produktion größerer Mengen des gewünschten Peptides verwendet werden, ohne daß wie im Phagensystem aufwendige Zyklen von Infektion (Phagenvermehrung) und Selektion (Phagenauswahl) notwendig sind. Gleichzeitig mit der Vermehrung des das korrekte Peptid oberflächenexponiert exprimierenden Stammes erfolgt eine Amplifikation des entsprechenden kodierenden Gens, dessen Sequenzanalyse eine eindeutige Identifizierung und Charakterisierung des Peptids mit einfachen und etablierten Techniken erlaubt. Diese erfindungsgemäßen Vorteile treffen auf alle mit der vorliegenden Erfindung oberflächenexponiert exprimierten Passagierdomänen, d.h. Peptide und Polypeptide zu.

Eine erfindungsgemäß hergestellte Peptidbibliothek enthält also Fusionsproteine, zusammengesetzt aus einem Autotransporter, in einer besonders bevorzugten Variante aus dem AIDA Autotransporter, und einem Peptid, das in einem Gram-negativen Bakterium, bevorzugt E.coli oberflächenexponiert produziert wird. Die hohe Varianz an verschiedenen exprimierten Peptiden ergibt sich in einem typischen Beispiel durch die Klonierung von degenerierten, synthetisch hergestellten Oli-

gonucleotiden zwischen die kodierenden Regionen für das Signalpeptid und den Autotransporter.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ermöglicht die vorliegende Erfindung die Expression von als Antigen wirkenden Proteinen oder Proteinfragmenten auf der Oberfläche von Gram-negativen Bakterien, bevorzugt von E.coli. Die Konstruktion eines derartigen Fusionsproteines erfolgte erfindungsgemäß unter Verwendung der β -Untereinheit des Toxins von *Vibrio cholerae* (CtxB) als Passagier und dem AIDA Autotransporter als Trägerprotein. Die Zugänglichkeit der oberflächenexponierten antigenen Domänen für in Frage kommende Bindungspartner wurde erfindungsgemäß nachgewiesen durch Markierung mit einem für CtxB spezifischen Antiserum. Dabei zeigte sich, daß die rekombinanten, in die Außenmembran des E.coli Wirtstammes eingelagerten Fusionsproteine bis zu 5 % des Gesamtzellproteins ausmachen können, was eine erheblich verbesserte Effizienz im Vergleich zu anderen Systemen bedeutet. Das hier beschriebene Verfahren ermöglicht somit die stabile Produktion und Präsentation von antigen wirkenden Proteinen oder Proteinfragmenten auf der Oberfläche von Gram-negativen Bakterien und in einer bevorzugten Ausführungsform deren Verwendung als Lebendvakzine, zur oralen Vakzinierung oder zum Screening von Seren oder Antikörperbanken. Die Verwendung von Bakterienzellen, beispielsweise attenuierten *Salmonella* Stämmen (Schorr et al., Vaccine 9 (1991) 675-681), mit oberflächenexponiert exprimierten antigen wirkenden Proteinen hat sich bei der Lebendvakzinierung als vorteilhaft gegenüber der intrazellulären bakteriellen Expression von Antigenen erwiesen.

Generell erlaubt die vorliegende Erfindung in einer bevorzugten Ausführungsform die Oberflächenexpression aller Passagiere, die in ihrem wesentlichen Bestandteil Peptide oder Proteine sind auf der Oberfläche von Gram-negativen Bakterien, insbesondere E.coli.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform dient die C-terminale Domäne des AIDA Proteins, der AIDA Autotransporter, als Membrananker zur Präsentation rekombinanter Polypeptide des Immunsystems, z.B. rekombinanter Antikörperdomänen auf der Oberfläche von Gram-negativen Bakterien. Die Oberflächenexpression von rekombinanten Antikörperfragmenten ermöglicht deren rasche Modifizierung wie auch die Bewertung und Untersuchung ihrer Antigen-bindenden Eigenschaften. So wird es möglich ganze Bibliotheken von funktionellen Antikörperfragmenten oberflächenexponiert zu produzieren und auf bestimmte vorgegebene Bindungseigenschaften oder Affinitäten hin zu testen. Der Vorteil der vorliegenden Erfindung gegenüber den bisher verwendeten Phagensystemen liegt darin, daß die Variation, d.h. die genetische Manipulation und die Produktion des Proteins in demselben Wirtsorganismus erfolgen kann. Dabei kann die genetische Manipulation eine gezielte sein (ortsspezifische Mutagenese) oder eine zufällige, unter Verwendung von degenerierten Oligonukleotiden zur Synthese einer intakten Fusion aus Antikörper-kodierendem Fragment als Passagier und dem Autotransporter als Trägerprotein. Ebenso kann die genetische Manipulation in Form von in vivo-Mutagenese erfolgen, indem man die Bakterien, die das Gen für das Fusionsprotein enthalten, energiereicher Strahlung (z.B. UV) oder chemischen, mutagen wirkenden Agenzien aussetzt.

Die erfindungsgemäße Selektion des Moleküls mit den korrekten Bindungseigenschaften geht einher mit der Selektion der produzierenden Bakterienzelle. Daraus wird ersichtlich, daß diese erfindungsgemäße Verfahrensweise in ihrer Strategie bestehend aus Variation und nachfolgender Selektion der natürlichen Strategie des Immunsystems zur bestmöglichen Anpassung von Bindungseigenschaften immunogener Moleküle angelehnt ist. Zur Expression funktioneller Antigen-bindender Teile von Antikörpern, die gewöhnlich nicht glykosyliert werden, auf der Oberfläche von Gram-negativen Bakterien, vorzugsweise E.coli sind verschiedene erfindungsgemäße Vorgehensweisen denkbar. Zwei monovalente Fragmente können zusammen präsen-

tiert werden durch getrennte Fusionen der leichten Kette (VL) und der schweren Kette (VH) mit jeweils einer Autotransporterdomäne, die unabhängig voneinander mit verschiedenen kompatiblen Vektoren oder unter Kontrolle verschiedener Promotoren auf dem gleichen Vektor in einer Wirtszelle exprimiert werden. Auf der Oberfläche lagern sich beide oberflächenexponiert vorliegenden Antikörperdomänen zu einem funktionellen Fv-Fragment zusammen, wobei die Stabilität der Interaktion durch eine chemisch induzierte Disulfidbrückenbildung oder anders geartetes chemisches cross-linking gefördert werden kann.

In einer weiteren erfindungsgemäßen Vorgehensweise werden Fusionsproteine hergestellt, die den Autotransporter als Trägerprotein enthalten, und als Passagier die leichte Kette (VL) und die schwere Kette (VH) einer Antigen-bindenden Domäne eines Antikörpers, verknüpft über ein kurzes Linker-Peptid (z.B. [Gly₄Ser]₃), das eine korrekte Zusammenlagerung der beiden Ketten zu einem funktionellen Fv-Fragment erlaubt. Bei der Konstruktion solcher single-chain (sc) Fv-Fragmente ist sowohl eine Verknüpfung des N-Terminus der leichten Kette mit dem C-Terminus der schweren Kette, wie auch eine Verknüpfung des N-Terminus der schweren Kette mit dem C-Terminus der leichten Kette möglich (Pluckthun Immun. Rev. 130 (1992), 151 - 188). Mit den beschriebenen Vorgehensweisen ist auch die Produktion eines kompletten Fab-Fragmentes möglich.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ermöglicht die vorliegende Erfindung die oberflächenexponierte Expression von MHC-Klasse II Molekülen in E.coli gegebenenfalls mit definierten eingelagerten Peptiden. Dabei sind zwei Strategien denkbar. In der einen Variante werden zwei verschiedene Fusionsproteine, die beide einen Autotransporter als Trägerprotein enthalten, auf getrennten kompatiblen Vektoren oder auf einem Vektor unter Kontrolle unterschiedlicher Promotoren in einer Wirtszelle exprimiert. Als Passagierprotein dient einmal die α -Kette des gewünschten MHC-Klasse II Subtyps und zum

anderen die β -Kette dieses Subtyps, an deren N-Terminus über einen Linker das gewünschte Peptid angehängt sein kann (Kozono et al., Nature 369 (1994) 151-154).

5 In der zweiten Variante wird ein Passagierprotein bestehend aus dem Peptid, der β -Kette und der α -Kette mit einem Auto-transporter fusioniert. Auf der Bakterienoberfläche lagern sich die α - und β -Kette zu einem funktionellen MHC-Molekül zusammen, wobei das Peptid sich korrekt in die Bindungsgrube
10 einlagert. Die Stabilität des Komplexes kann durch chemisch induzierte Disulfidbrückenbildung unterstützt werden. Die Variation des eingelagerten Peptides ist möglich durch ortsspezifische Mutagenese oder/und durch den Einsatz von degenerierten Oligonukleotidprimern bei der Herstellung der die
15 Fusionsproteine kodierenden DNA-Fragmente, ebenso wie durch in vivo-Mutagenese Methoden unter Verwendung von energiereicher Strahlung oder/und chemischen Mutagenen.

Auch hier wird noch einmal der Vorteil des erfindungsgemäßen
20 Verfahrens deutlich. Variation des Bindungspartners, Expression, Selektion des Moleküls mit den optimalen Eigenschaften, Sequenzanalyse und stabile Produktion kann in einem Wirtstamm erfolgen. Damit wird beispielsweise auch eine rasche Charakterisierung von Varianten bereits bekannter Liganden mit bes-
25 seren Bindungseigenschaften möglich und damit eine Liganden- oder Rezeptoroptimierung.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ermöglicht die vorliegende Erfindung die Oberflächenexpression von immunmo-
30 dulatorischen Rezeptoren wie beispielsweise CD1, Fc-Rezeptor oder MHC-Klasse I Molekülen, sowie deren gezielte Variation.

In weiteren bevorzugten Ausführungsform ermöglicht die vor-
liegende Erfindung die Oberflächenexpression von T-Zellrezept-
35 toren oder Teilen davon, aber auch von weiteren Oberflächenantigenen eukaryontischer Zellen oder Zellen des Immunsystems.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die oberflächenexprimierten Proteinfragmente oder Peptide T-Zellepitope, die im Anschluß an die Aufnahme der Bakterien durch adäquate Zelllinien oder Primärzellen, wie z.B. Makrophagen
5 als in MHC-Moleküle der Klasse I oder II eingelagerte Peptide präsentiert werden und zur Stimulation spezifischer T-Zellen dienen können.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ermöglicht das
10 erfindungsgemäße Verfahren die Oberflächenexpression und die Variation eines Peptids oder Polypeptids mit einer Affinität zu einem Bindungspartner, eines Liganden, eines Rezeptors, eines Antigens, eines Toxin-bindenden Proteins, eines Proteins mit enzymatischer Aktivität, eines Nukleinsäure-bindenden
15 Proteins, eines Inhibitors, eines Chelator-Eigenschaften habenden Proteins, eines Antikörpers oder einer Antigen-bindenden Domäne eines Antikörpers.

Unter dem Begriff "Bindungspartner" wird erfindungsgemäß ein
20 Element, ein Molekül, eine chemische Verbindung oder ein Makromolekül verstanden, wobei der Bindungspartner und/oder die, die Fusionsproteine exprimierenden Bakterienzellen frei löslich, gebunden an eine Matrix oder aber assoziiert mit einer biologischen Membran vorliegen.

25 Der Begriff "Antigen bindende Domäne" bezeichnet erfindungsgemäß mindestens den Bereich eines Antikörpermoleküls, der hinreichend ist für die spezifische Bindung eines Antigens.

30 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ermöglicht die vorliegende Erfindung eine chemische, physikalische oder/und enzymatische Modifikation des oberflächenexponierten Passagierpeptids bzw. -polypeptids oder Teilen davon, wobei die Modifikation eine kovalente Modifikation, eine nicht-kovalente
35 Modifikation, eine Glykosilierung, eine Phosphorylierung oder eine Proteolyse sein kann.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung einer varianten Population von oberflächenexponierten Peptiden und zur Identifizierung von Bakterien, die Peptide bzw. Polypeptide mit einer jeweils gewünschten Eigenschaft tragen, gliedert
s sich in folgende Schritte:

- (1) Herstellen eines oder mehrerer Fusionsgene durch Klonierung der kodierenden Sequenz eines gewünschten Passagiers in frame mit der kodierenden Sequenz der Transportdomäne eines Autotransporters und eines Signalpeptides, wobei die einzelnen Teilfragmente über PCR amplifiziert oder aus Restriktionsverdauungen anderer DNA stammen können, in mindestens einen Vektor;
- (2) Variieren des Passagiers durch Mutagenese z.B. durch ortsspezifische Mutagenese, Verwendung von degenerierten Oligonukleotidprimern in der PCR, durch chemische Mutagenese oder durch Verwendung energiereicher Strahlung;
- (3) Einbringen des Vektors oder der Vektoren in Wirtsbakterien;
- (4) Exprimieren des Fusionsgens bzw. der Fusionsgene in den Wirtsbakterien, die das Fusionsprotein oder die Fusionsproteine stabil an der Oberfläche präsentieren.
- (5) Kultivieren der Bakterien z.B. in Flüssigkultur oder auf Agarplatten zur Produktion des stabil oberflächenexponiert präsentierten Passagiers oder der stabil oberflächenexponiert präsentierten Passagiere;
- (6) gegebenenfalls Selektionieren der Bakterien, die den Passagier oder die Passagiere mit den gewünschten Eigenschaften auf der Oberfläche tragen und
- (7) gegebenenfalls Charakterisieren eines Bindungspartners für den Passagier mit den optimalen Eigenschaften.

Dabei kann erfindungsgemäß dieses Verfahren mehrmals durch-
laufen werden, um die Eigenschaften des oberflächenexponier-
ten Peptids bzw. Polypeptids schrittweise dem gewünschten
Bindungsverhalten anzupassen oder in einem ersten Schritt den
5 Bindungspartner bezüglich einer Eigenschaft zu optimieren und
in einem zweiten Schritt bezüglich einer oder mehrerer ande-
rer Eigenschaften. Erfindungsgemäß können aber auch in Abhän-
gigkeit der gewünschten Anwendung auch nur einzelne Teil-
schritte des Verfahrens miteinander verknüpft werden, in ei-
10 nem typische Beispiel die Teilschritte (1), (3), (4) und (5),
aber auch alle anderen möglichen Kombinationen.

In einer bevorzugten Ausführungsform dieses Verfahrens ent-
hält das Fusionsprotein als Trägerprotein die Autotranspor-
15 terdomäne des AIDA Proteins oder eine Variante davon, die
eine Sezernierung des Fusionsproteines ermöglicht.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform dieses Verfah-
rens enthält das Fusionsprotein als Trägerprotein den SepA.
20 Autotransporter oder einen Teil davon, oder den IcsA
Autotransporter oder einen Teil davon, oder den Tsh
Autotransporter oder einen Teil davon, oder den Ssp
Autotransporter oder einen Teil davon, oder den Hap
Autotransporter oder einen Teil davon, oder den Prn
25 Autotransporter oder einen Teil davon, oder den Hsr
Autotransporter oder einen Teil davon, oder den BrkA
Autotransporter oder einen Teil davon, oder den Vaca
Autotransporter oder einen Teil davon oder einen Rickettsia-
Autotransporter oder einen Teil davon,
30 die jeweils die Sezernierung des Fusionsproteines
ermöglichen.

Die Expression multimerer Proteine wird erfindungsgemäß mö-
glich durch Herstellung verschiedener Fusionsproteine in ei-
35 ner Zelle, die sich auf der Oberfläche zu einer funktionellen
Einheit zusammenlagern.

Die geringe Generationszeit der als Wirtsorganismen verwendbaren Bakterien ermöglicht einen permanenten Zyklus von Variation und Selektion, der eine evolutionsartige Anpassung des Passagierpoteins, aber auch des Autotransporters an vorgegebene Eigenschaften ermöglicht. Dabei kann es sich in einem typischen Beispiel um Bindungsaffinitäten zwischen dem Passagierprotein und einem Bindungspartner handeln. Die Isolierung der Bakterien mit dem stabil exponierten Fusionsprotein erfolgt in einer bevorzugten Ausführungsform dieses Verfahrens durch Bindung an einen immobilisierten oder/und markierten Bindungspartner, z.B. einen Matrix-fixierten Bindungspartner, an einen Fluoreszenz-markierten Bindungspartner, einen Magnetpartikel-markierten Bindungspartner oder einen chromogen markierten Bindungspartner. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist der Bindungspartner so modifiziert, daß er in einem zweiten Schritt durch einen für die Modifikation spezifischen Bindungspartner detektiert werden kann.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung von stabil exprimierten Fusionsproteinen oder Teilen davon oder von Bakterien mit stabil auf der Oberfläche exprimierten Fusionsproteinen und deren Verwendung für therapeutische Zwecke oder diagnostische Zwecke, bei der Schadstoffanreicherung oder Entfernung, bei der Inaktivierung von Toxinen, bei der Rohstoffmobilisierung, bei der Lebensmittelherstellung oder -verarbeitung, bei der Waschmittelherstellung, bei der Markierung von ausgesuchten eukaryontischen oder prokaryontischen Zellen. Erfindungsgemäß können Antikörper oder Antikörperfragmente stabil auf der Oberfläche exprimierende Bakterien, in einem typischen Beispiel unter Verwendung des AIDA Autotransporters als Transporterdomäne zur Produktion derselben verwendet werden, wobei diese Antikörper oder Antikörperfragmente anschließend, gegebenenfalls nach einer Aufreinigung für diagnostische oder therapeutische Zwecke eingesetzt werden. Mit solchen Antikörpern oder Antikörperfragmenten wäre es beispielsweise möglich, Zellen mit

bestimmten Oberflächenmarkern, als typisches Beispiel seien hier Tumorantigene genannt, spezifisch zu bezeichnen oder zu selektionieren. In einem weiteren typischen Beispiel handelt es sich bei den markierten Oberflächenmarkern um Rezeptoren, wobei die Markierung einhergeht mit der Blockierung der oder einer der Rezeptoreigenschaften, womit eine gezielte Inhibition einer durch den Rezeptor ausgelösten oder vermittelten Signaltransduktion und der damit verbundenen Zellfunktion möglich wird.

Beschreibung der Figuren

Figur 1:

Hydrophobizität der C-terminalen 300 Aminosäuren des AIDA-I Proteins.

Die für Autotransporter typische Pore in der Außenmembran Gram-negativer Bakterien wird gebildet durch amphipatische β -Faltblattstrukturen, d.h. von Domänen mit β -Faltblattstruktur und alternierend hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren.

Dies kann man sichtbar machen, indem man einen relativen Hydrophobizitätswert der Aminosäure, der mittels eines bestimmten Algorithmus der Aminosäure zugeordnet wurde, gegen die Position der Aminosäure aufträgt. Es wurde der Algorithmus von Vogel und Jähnig (J. Mol Biol. 190 (1986) 191-199) verwendet. Die Pfeile zeigen die möglichen Membrandurchgänge an, wobei Pfeil nach links bedeutet, daß der Membrandurchgang von innen nach außen verläuft und Pfeil nach rechts Membrandurchgang von außen nach innen anzeigt. SP deutet eine relative Oberflächenwahrscheinlichkeit der Aminosäuren berechnet nach Emini et al. (J. Virol. 55 (1985), 836-839) an.

Figur 2:

Modell des Autotransporters aus dem AIDA-I Protein.

Ausgehend von der Auftragung der relativen Hydrophobizität einer Aminosäure gegen ihre Position (Figur 1) läßt sich die durch die antiparallelen, amphipatischen β -Faltblätter gebildete Faßstruktur als Modell darstellen. Die hier dargestellte

aufgeschnittene Faßstruktur, wird in der Membran durch Interaktion des ersten mit dem antiparallelen letzten Membrandurchgang geschlossen. Die in Rauten geschriebenen Aminosäuren befinden sich im Membranbereich, wobei fett umrandete relativ hydrophob sind und zur Außenseite des Faßes, also zur Membran hin orientiert sind, während dünn umrandete relativ hydrophil sind und mit ihren Seitenketten zur Innenseite der Pore hin zeigen. In Kreisen gezeichnete Aminosäuren bilden Schleifen außerhalb der Membran. Alanin an Position 1 des Modells trägt in der vollständigen Sequenz von AIDA-I die Nummer 1014, während das terminale Phenylalanin in der vollständigen Sequenz die Nummer 1286 trägt (Benz und Schmidt, Mol Microbiol 11 (1992), 1539-1546).

Figur 3 a:

Herstellung von pJM7, eines Vektors zur Oberflächenexpression von CtxB.

pJM7 enthält eine Genfusion (FP59) aus dem Choleratoxin B und der AIDA-Linker-/ β -Faß-Region. Diese Genfusion wird unter der Kontrolle des künstlichen Promotors PTK (Klauser et al, EMBO J. 9 (1990) 1991-1999) in einem Vektor mit hoher Kopienzahl konstitutiv exprimiert. Das ctxB-Gen wurde mit den Oligonukleotiden EF16 und JM6 aus dem Plasmid pTK1 (Klauser et al, EMBO J. 9 (1990) 1991-1999) durch PCR amplifiziert. Der Autotransporter, bestehend aus dem β -Faß und der Linkerregion aus AIDA-I wurde durch Amplifikation mit den Oligonukleotiden JM1 und JM7 aus einer Plasmid-DNA-Präparation von E.coli EPEC 2787 (Benz und Schmidt, Infect. Immun. 57 (1989), 1506-1511) amplifiziert. Das Oligonukleotid JM 1 enthält in seinem 5'-Überhang eine BglII-Erkennungssequenz, die Oligonukleotide JM6 und JM7 enthalten je eine KpnI-Erkennungssequenz. Die Vektor-DNA (pBA) wurde mit ClaI und BamHI hydrolysiert und die beiden PCR-Produkte wurden im Anschluß an die Amplifikation mit ClaI und KpnI (EF16/JM6-Fragment) bzw. mit BglII und KpnI (JM7/JM1-Fragment) nachgeschnitten. Die so generierten drei Fragmente wurden in einer Ligation kondensiert.

Figur 3 b:

Herstellung von pJM22, eines Vektors zur Oberflächenexpression von Peptiden.

pJM22 produziert das Fusionsprotein FP50, das aus drei Domänen besteht. Am N-terminalen Ende liegt die CtxB-Signalsequenz, die für den Export des entstehenden Fusionsproteins über die Zellmembran (Sec-vermittelt) sorgt. Daran anschließend folgt die Passagierdomäne, in diesem Fall ein Peptid, das Epitop PEYFK. C-terminal endet das Fusionsprotein mit der AIDA- β -Faß/Linker-Region, dem Autotransporter, welcher die N-terminal um das Signalpeptid verkürzte Passagierdomäne auf die Oberfläche von E.coli befördert. Zur Konstruktion von pJM22 wurde zunächst die DNA von pJM7 mit XhoI hydrolysiert und der Vektoranteil von pJM7 durch PCR mit den Oligonukleotiden JM7 und JM20 amplifiziert. Dabei wurde das ctxB-Gen mit Ausnahme seiner Signalsequenz deletiert. Das Oligonukleotid JM20 enthielt in seinem 5'-Überhang zusätzlich zu der KpnI-Schnittsequenz fünf Codons, die für die Aminosäuren PEYFK kodieren. Diese Aminosäurenabfolge stellt ein lineares Epitop für den monoklonalen Antikörper Dül42 dar. Das PCR-Produkt wurde mit KpnI hydrolysiert und anschließend mit sich selbst ligiert.

Figur 4

25 Expressionsnachweis und Proteasesensitivität.

Aufgrund der starken stabilen Expression der Fusionsproteine FP59 (von pJM7 aus) und FP50 (von pJM22 aus) in E.coli sind diese leicht in einem mit Coomassie Brilliant Blue gefärbten Ganzzelllysatz zu identifizieren. Proteasezugänglichkeit stellt ein übliches Mittel zur Bestimmung der Lokalisierung eines Proteins dar. Zu zelleigenen Proteinen ist nur dann Zugang zu erwarten, wenn diese auf der Außenseite der Bakterie präsentiert werden oder wenn die Außenmembran der Bakterie für Proteasen durchlässig wird. Um letzteres auszuschließen kann man einen Protease-sensitiven Marker benutzen, von dem bekannt ist, daß er natürlicherweise im Periplasma vorliegt. Nur wenn dieser nicht von der eingesetzten Protease angegriffen wird,

ist die Integrität der Außenmembran gewährleistet. Zellen von E.coli UT5600 bzw. JK321 wurden über Nacht auf LB-Agar (50 mg/l Ampicillin) angezogen und in PBS suspendiert. Die Zellsuspensionen wurde auf eine OD578 = 4,0 eingestellt. Zellen
5 von 0,5 ml Zellsuspension wurden 1 min in der Tischzentrifuge sedimentiert und in 200 µl PBS mit 0,1 mg/ml Protease resuspendiert. Die Ansätze wurden 20 min bei 37° C inkubiert und durch Abkühlung auf 0° C, einminütiges Sedimentieren und Resuspendieren des Pellets in 40 µl SDS-PAGE-Probenpuffer und
10 sofortiges fünfzehnminütiges Kochen gestoppt. Die Auswertung erfolgte nach SDS-PAGE durch Western-Blotting (4b und 4c) oder durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blue (4a). Um auszuschließen, daß die Proteasen Zugang zum Periplasma hatten, wurden nicht nur Antiseren, die spezifisch für die Passagier-
15 proteindomänen sind, eingesetzt sondern auch ein Antiserum spezifisch für den C-terminalen Teil von OmpA, der natürlicherweise unzugänglich im Periplasma vorliegt und deshalb durch extern zugesetzte Proteasen wie Trypsin nicht angreifbar sein sollte (4c).

20

Figur 4a:

SDS-PAGE und anschließende Färbung mit Coomassie Brilliant Blue zum Nachweis der Proteasesensitivität und zur Quantifizierung der Expression. Aufgetragen wurden Ganzzelllysate von
25 E.coli JK321 und E.coli UT5600.

Spur 1	JK321 pJM7 C *
Spur 2	JK321 pJM7 T**
Spur 3	JK321 pJM7 -***
30 Spur 4	Molekulargewichtsmarker (94, 67, 43, 30, 20 und 14 kDa)
Spur 5	JK321 pJM22 C
Spur 6	JK321 pJM22 T
Spur 7	JK321 pJM22 -
35 Spur 8	JK321 pTK61 C
Spur 9	JK321 pTK61 T
Spur 10	JK321 pTK61 -

Spur 11 UT5600 pJM7 C
Spur 12 UT5600 pJM7 T
Spur 13 UT5600 pJM7 -
Spur 14 Molekulargewichtsmarker (94, 67, 43, 30, 20 und
5 14 kDa)
Spur 15 UT5600 pJM22 C
Spur 16 UT5600 pJM22 T
Spur 17 UT5600 pJM22 -
Spur 18 UT5600 pTK61 C
10 Spur 19 UT5600 pTK61 T
Spur 20 UT5600 pTK61 -

C* Zellen wurden mit Chymotrypsin verdaut

T** Zellen wurden mit Trypsin verdaut

15 *** native Zellen

Figur 4 b:

Western-Blot zum Nachweis der Expression und der Proteasesensitivität

20 Aufgetragen wurden Ganzzelllysate von E.coli JK321 und E.coli UT5600. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine aus dem Gel nach dem Semi-dry-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Anschließend wurden die Filter mit Blocklösung (PBS mit 0,5% Tween 20 und 0,5 M NaCl) 10 min blockiert
25 und das erste Antiserum, AK55 (Kaninchen-Anti-Choleratoxin B) 1:200 in Blocklösung verdünnt, zugegeben. Zum Nachweis des Epitops PEYFK wurde der Hybridom-Überstand Dül42 1: 35 verdünnt in Blocklösung zugegeben. Die Filter wurden 1 h mit den primären Antikörpern inkubiert, anschließend dreimal gewaschen und 30 min mit ProteinA-Alkalische-Phosphatase-Konjugat
30 (1: 500 in Blocklösung) inkubiert. Die Filter wurden mit NBT/BCIP-Färbelösung entwickelt.

Spur 1 JK321 pJM7 C *
35 Spur 2 JK321 pJM7 T**
Spur 3 JK321 pJM7 -***
Spur 4 Molekulargewichtsmarker (106, 80, 50, 32, 27 und

18 kDa)

	Spur 5	JK321 pJM22 C
	Spur 6	JK321 pJM22 T
	Spur 7	JK321 pJM22 -
5	Spur 8	JK321 pTK61 C
	Spur 9	JK321 pTK61 T
	Spur 10	JK321 pTK61 -
	Spur 11	UT5600 pJM7 C
	Spur 12	UT5600 pJM7 T
10	Spur 13	UT5600 pJM7 -
	Spur 14	Molekulargewichtsmarker (106, 80, 50, 32, 27 und 18 kDa)
	Spur 15	UT5600 pJM22 C
	Spur 16	UT5600 pJM22 T
15	Spur 17	UT5600 pJM22 -
	Spur 18	UT5600 pTK61 C
	Spur 19	UT5600 pTK61 T
	Spur 20	UT5600 pTK61 -

- 20 C* Zellen wurden mit Chymotrypsin verdaut
T** Zellen wurden mit Trypsin verdaut
-*** native Zellen

Figur 4 c:

- 25 Nachweis der Integrität der Außenmembran durch Western-Blot--
Analyse.

Aufgetragen wurden Ganzzelllysate von E.coli JK321 und E.coli
UT5600. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine aus dem
Gel nach dem Semi-dry-Verfahren auf eine Nitrozellulosemem-
30 bran übertragen. Anschließend wurden die Filter mit Blocklö-
sung (PBS mit 0,5% Tween 20 und 0,5 M NaCl) 10 min blockiert
und das erste Antiserum, K56 (Kaninchen Anti-OmpA) 1: 1000 in
Blocklösung verdünnt, zugegeben. Die Filter wurden 1 h mit
dem primären Antiserum inkubiert, anschließend dreimal gewa-
35 schen und 30 min mit Protein A Alkalische-Phosphatase-Konju-
gat (1: 500 in Blocklösung) inkubiert. Entwickelt wurden die
Filter mit NBT/BCIP-Färbelösung. OmpA ist ein Außenmembran-

protein von E.coli mit einem C-terminalen periplasmatischen Anteil. Dieser periplasmatische Teil ist Trypsin-sensitiv. Wenn Trypsin Zugang zum Periplasma hat, wird vom reifen OmpA (35 kDa) ein circa 10 - 11 kDa großer Teil abgedaut. Ein Verdau würde also in einer Versetzung der OmpA-Bande im Western-Blot von 35 kDa nach 25 kDa resultieren (Klauser et al, EMBO J. 9 (1990) 1991- 1999), was bei Verwendung des AI-DA-I Autotransporters zum Transport rekombinanter Proteine offensichtlich nicht der Fall ist

10

Spur 1	JK321 pTK1 T*
Spur 2	JK321 pJM7 T
Spur 3	JK321 pJM22 T
Spur 4	JK321 pTK61 T
15 Spur 5	Molekulargewichtsmarker (106, 80, 50, 32, 27 und 18kDa)
Spur 6	JK321 pTK1 -**
Spur 7	JK321 pJM7 -
Spur 8	JK321 pJM22 -
20 Spur 9	JK321 pTK61 -
Spur 10	leer
Spur 11	UT5600 pTK1 T*
Spur 12	UT5600 pJM7 T
Spur 13	UT5600 pJM22 T
25 Spur 14	UT5600 pTK61 T
Spur 15	Molekulargewichtsmarker (106, 80, 50, 32, 27 und 18kDa)
Spur 16	UT5600 pTK1 -**
Spur 17	UT5600 pJM7 -
30 Spur 18	UT5600 pJM22 -
Spur 19	UT5600 pTK61 -

T* Zellen wurden mit Trypsin verdaut

** native Zellen

35

Figur 5

Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz ganzer, nicht permeabilisierter Zellen stellt eine übliche Methode des Nachweises auf der Zelloberfläche exponierter Determinanten dar. Die dabei zur Detektion der Determinanten eingesetzten Antikörper sind zu groß, um
s durch die intakte Außenmembran zu gelangen. Zur Unterscheidung und zur Abschätzung der Hintergrundaktivität von periplasmatisch oder zellulär exprimierten Determinanten benutzt man als Kontrolle Antikörper gegen bekanntermaßen periplasmatisch bzw. zellulär exprimierte Antigene.

10

Zellen von E.coli UT5600, die eines der Plasmide pBA, pTK1, pTK61, pJM7 oder pJM22 enthielten, wurden über Nacht auf LB-Agar (Ampicillin 50 mg/l) angezogen und in PBS bis zu einer optischen Dichte von 0,1 bei 578 nm suspendiert. Mit 500 μ l
15 dieser Zellsuspension wurden Deckgläser, die in 24 Loch-Mikrotiterplatten lagen, überschichtet. Die Zellen wurden 5 min in der Plattenzentrifuge auf die Deckgläser sedimentiert. 450 μ l des Überstands wurden abgehoben und durch PBS mit 2,5% PFA (Paraformaldehyd) ersetzt, womit 20 min lang fixiert wurde.
20 Der Überstand wurde gänzlich abgehoben und es wurde dreimal mit 500 μ l PBS gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch 5 min Inkubation mit 300 μ l PBS, das 1% FCS enthielt, blockiert. Die Blockierungslösung wurde restlos abgehoben, die Deckgläser in ihren Vertiefungen zentriert, mit 15
25 μ l einer 1:100 Verdünnung des Kaninchenserums AK55 (gegen Choleratoxin B entwickelt) bedeckt und 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit je 500 μ l PBS gewaschen, 5 min mit 350 μ l PBS/FCS blockiert und mit 15 μ l einer 1: 100 Verdünnung eines Ziegen-
30 Anti-Kaninchen-Texasrot-Konjugats 30 min inkubiert. Nach folgendem dreimaligem Waschen wurden die Deckgläser auf Objektträger gelegt und mit Einbettungsmedium eingebettet. Das Ergebnis der Immunfluoreszenz wurde mikroskopisch beurteilt und bei gleichlangen Belichtungszeiten photographisch festgehalten.
35 ten.

- a) E.coli UT5600 pBA (als Negativkontrolle benutzter Stamm, der nur den Klonierungsvektor ohne Insert enthält)

- b) E.coli UT5600 pTK1 (produziert das Choleratoxin B, das ins Periplasma exportiert wird. Dieses Konstrukt dient zur Bestimmung der Hintergrundaktivität des periplasmatisch exprimierten Choleratoxin B).
- 5 c) E.coli UT5600 pJM7 (exprimiert FP59, das Fusionsprotein aus AIDA und Choleratoxin B, welches auf der Oberfläche von E.coli präsentiert wird).
- d) E.coli UT5600 pJM22 (exprimiert FP50, das Fusionsprotein aus AIDA und dem Epitop PEYFK. Mit diesem Konstrukt wird
10 demonstriert, daß der AIDA-Anteil der FP59 und FP50 keine Kreuzreaktivität mit dem in diesem Experiment benutzten AK55 aufweist).
- e) E.coli UT5600 pTK61 (produziert ein Fusionsprotein aus Choleratoxin B und Iga- β , das auf der Oberfläche von
15 E.coli präsentiert wird (Klauser et al., EMBO J. 9 (1990) 1991- 1999). Dient dem Vergleich mit dem AIDA--Konstrukt FP59).

Figur 6

20 DNA-Sequenzen der verwendeten Oligonucleotide

Figuren 7-24

DNA-Sequenz (nicht-kodierender Strang) und davon abgeleitete Aminosäuresequenzen von bakteriellen Autotransportern.

25

Figur 7

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Autotransporters von AIDA-I aus Escherichia coli (Benz und Schmidt, Mol.Microbiol. 6 (1992), 1539-1546).

30

Figur 8

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Autotransporters von BrkA aus Bordetella pertussis (Fernandez und Weiss, Infect Immun. 62 (1994), 4727-4738).

35

Figur 9

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-

transporters von Hap aus *Haemophilus influenzae* (StGeme et al., Mol.Microbiol. 14 (1994), 217-233).

Figur 10

- 5 Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von Hsr aus *Helicobacter mustelae* (O'Toole et al., Mol.Microbiol 11 (1994), 349-361).

Figur 11

- 10 Darstellungen des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von IcsA aus *Shigella flexneri* (Goldberg et al., J.Bacteriol 175 (1993), 2189-2196).

Figur 12

- 15 Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von Prn (outer membrane protein P96) aus *Bordetella pertussis* (Charles et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 86 (1989), 3554-3558).

20 Figur 13

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von Prn (P70, Pertactin) aus *Bordetella parapertussis* (Li et al., J.Gen.Microbiol. 138 (1992), 1697-1705).

25 Figur 14

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von dem 190 kDa cell surface antigen aus *Rickettsia rickettsii* (Anderson et al., unveröffentlicht, Genbank-Accessionnr. M31227).

30

Figur 15

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von SpaP aus *Rickettsia prowazekii* (Carl et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 87 (1990), 8237-8241).

35

Figur 16

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-

transporters aus dem 120 kilodalton outer membrane protein (rOmp B) von *Rickettsia rickettsii* (Gilmore et al., Mol.Microbiol. 5 (1991), 2361-2370).

5 Figur 17

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von SlpT aus *Rickettsia typhi* (Hahn et al., Gene 133 (1993), 129-133).

10 Figur 18

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von SepA aus *Shigella flexneri* (Benjellou-Touimi et al., Mol.Microbiol 17 (1995), 123-135).

15 Figur 19

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von Ssp aus *Serratia marcescens* RH1 (Rho, unveröffentlicht, Genbank-Accessionnr. X59719).

20 Figur 20

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von Ssp von *S.marcescens* IFO-3046, clone pSP11 (Yanagida et al., J.Bacteriol. 166 (1986), 937-944).

25 Figur 21

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von Ssp-h1 aus *Serratia marcescens*, strain IFO3046 (Onishi und Horinouchi, unveröffentlicht, Genbank-Accessionnr. D78380).

30

Figur 22

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von Ssp-h2 aus *Serratia marcescens*, strain IFO3046 (Onishi und Horinouchi, unveröffentlicht, Genbank-

35 Accessionnr. D78380).

Figur 23

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von Tsh aus *Escherichia coli* (Provence et al. 1994, *Infect.Immun.* 62 (1994), 1369-1380).

5 Figur 24

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von VacA aus *Helicobacter pylori* (Schmitt und Haas, *Mol.Microbiol.* 12 (1994), 307-319). Von VacA sind noch mindestens 3 weitere Formen bei *Helicobacter pylori* bekannt,
10 die sich aber in dem angegebenen Bereich nicht wesentlich unterscheiden.

BEISPIELE

Beispiel 1:

5

Identifizierung und Lokalisierung des Autotransporters in einem Oberflächenprotein von *Escherichia coli*.

Um einen für die gewünschte Anwendung adäquaten Autotransporter, d.h. angepaßt an das Passagierprotein und den zu verwendenden Wirtsstamm, zu finden, ist es notwendig eine Analyse der C-terminalen Aminosäuresequenz eines in Frage kommenden Proteins durchzuführen. Dabei kann es sich um ein bereits als Oberflächenfaktor identifiziertes Protein handeln, aber auch um eine in einer Datenbank abgelegte Aminosäuresequenz eines Proteins mit unbekannter Funktion, um eine von einer in einer Datenbank abgelegten DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz eines Proteins oder die im Anschluß an eine Sequenzanalyse von einem Gen abgeleitete Aminosäuresequenz eines Proteins. Der N-Terminus des Proteins sollte eine Signalpeptidsequenz enthalten um einen Transport über die innere Membran zu ermöglichen und am C-Terminus sollte der in die Membran intergrierte Teil mit der aromatischen Aminosäure Phenylalanin oder Tryptophan beginnen, gefolgt von abwechselnd polaren (oder geladenen) und hydrophoben (oder aromatischen) Aminosäuren. Die Passagierdomäne sollte wenig Cysteine und überhaupt keine Disulfidbrücken enthalten, da sich gezeigt hat, daß diese einen Transport des Passagiers durch die gebildete Pore blockiert. Der Hydrophobizitätsplot sollte eine gerade Anzahl von amphipatischen β -Faltblattstrukturen anzeigen, aus denen sich die Außenmembranpore konstituiert. Die amphipatischen β -Faltblattstrukturen sollten ca. 12 Aminosäuren lang sein und ein Minimum an geladenen Aminosäuren zur Membranseite hin orientiert enthalten, wobei die Membrandurchgänge verbindenden Schleifen zum Periplasma hin wenige Aminosäuren enthalten. Zur Außenseite (Medium) hin können erheblich mehr Aminosäuren vorliegen. Daraus ergeben sich im

Hydrophobizitätsplot eine Zusammenlagerung der Membrandurchgänge in antiparallelen Paaren mit Ausnahme des ersten und des letzten Membrandurchgangs, die durch antiparallele Zusammenlagerung miteinander die Faßstruktur der Pore vollenden. Ausgehend von der Erfüllung dieser Kriterien läßt sich nun ein Modell des Autotransporters aufstellen, mit Hilfe dessen die Lage und Ausdehnung der für den Transport notwendigen Aminosäuren festgelegt werden kann. Zusätzlich zu den für die Pore notwendigen Aminosäuren muß für einen funktionsfähigen Autotransporter auch noch eine sogenannte Linkerregion, die vom periplasmatisch gelegenen N-Terminus der β -Faßstruktur durch die Pore an die Oberfläche verläuft, in das Fusionsprotein mitübernommen werden, damit die Oberflächenexposition aller Passagierdomänen vollständig gewährleistet ist.

Erstes Ziel der vorliegenden Erfindung war es ein System zur optimierten Oberflächenexposition rekombinanter Proteine in *E. coli* bereitzustellen. Deshalb wurde nach einem Autotransporter in einem natürlichen Oberflächenprotein von *E. coli* gesucht. Die Wahl fiel auf das Adhesin AIDA-I (Adhesin Involved in Diffuse Adherence, Benz und Schmidt Infect. Immun. 57 (1989) 1506-1511), dessen Sequenz in Datenbanken verfügbar war. Erfindungsgemäß zeigte sich eine Signalsequenz am N-Terminus von 49 Aminosäuren, während am C-Terminus die erfindungsgemäßen Vorgaben durch die Aminosäurenabfolge FSYKI (Phenylalanin-Serin-Tyrosin-Lysin-Isoleucin) erfüllt waren. Die transportierte Domäne enthielt keine Cysteine und durch den Hydrophobizitätsplot (Figur 1) wurden 14 antiparallele, amphipatische β -Faltblattstrukturen vorhergesagt. Somit sind für die Bildung der Pore mindestens die Aminosäuren von Alanin an Position 1014 der gesamten Aminosäuresequenz (Benz und Schmidt, Mol. Microbiol. 6 (1992) 1539-1546) bis zu Phenylalanin an Position 1286 notwendig (Figur 2). Als Linkerregion wurden zusätzlich Aminosäuren, die sich N-terminal an das Alanin 1014 anschließen ausgewählt. Die somit ausgewählte funktionelle Autotransporterregion konnte nun mittels PCR aus

der DNA des entsprechenden E.coli EPEC2787 isoliert werden und zur Konstruktion eines Fusionsproteins verwendet werden.

Beispiel 2:

- 5 Konstruktion eines oberflächenexponierten Fusionsproteins mit einer antigenen Determinante als Passagierprotein

Ausgehend von den Annahmen, daß es sich bei AIDA-I um einen Autotransporter handelt und daß eine Genfusion aus einem beliebigen Passagier und einem E.coli-eigenen Autotransporter (nämlich AIDA- β) für E.coli besser verträglich sein sollte als eine Genfusion desselben Passagiers mit einem heterologen Autotransporter (z.B. Iga- β) wurde eine Genfusion zwischen aida- β und einem Gen für ein Passagierprotein vorgenommen. Um den Transport des Passagiers zu gewährleisten, wurde nicht nur AIDA- β sondern auch eine N-terminal vom β -Faß gelegene Verbindungsregion ("Linker") kloniert.

Als Passagier wurde CtxB ausgewählt und das entsprechende Gen aus pTK1 (Klauser et al, EMBO J. 9 (1990), 1991-1999) mit den Oligonukleotiden EF16 und JM6 mittels PCR amplifiziert. Da AIDA-I Plasmid-kodiert in E.coli EPEC 2787 (Benz und Schmidt, Infect. Immun. 57 (1989), 1506-1511) vorliegt, wurde der AIDA-I Autotransporter mit Linkerregion ebenfalls durch PCR mit den Oligonukleotiden JM1 und JM7 aus einer Plasmidpräparation von E.coli EPEC 2787 amplifiziert. Die beiden PCR-Produkte wurden mit Restriktionsenzymen verdaut, deren Erkennungssequenzen in den Oligonukleotiden enthalten waren. Die beiden so entstandenen Fragmente wurden in einen passend vorverdauten Klonierungsvektor (pBA) mit hoher Kopienzahl kloniert. So entstand ein Konstrukt mit einem künstlichen konstitutiven Promotor (PTK; Klauser et al., EMBO J. 9 (1990) 1991-1999) vor einer Genfusion bestehend aus ctxB am 5'-Ende (kodierend für die Aminosäuren 1-113), gefolgt von einem AIDA-I Linker (kodierend für die Aminosäuren 116-279 des Fusionsproteins) und dem AIDA-I Autotransporter (kodierend für die Aminosäuren 280-563 des Fusionsproteins) am 3'-Ende (Figur 3a). Die ent-

standene Genfusion wurde FP59 benannt.

Die verglichen mit dem bisher existierenden System Iga- β substantiell stärkere Expression, die ohne die bei Iga- β zu beobachtende Neigung zur Lyse erzielt wurde, konnte eindeutig durch vergleichende Elektrophorese von Ganzzell-Lysaten (Figur 4a) demonstriert werden.

Der Nachweis der Oberflächenexposition von FP59 wurde durch verschiedene Methoden geführt. Die Proteasesensitivität von FP59 zeigte sich im Protein-Gel durch eine Verringerung des Molekulargewichts im Anschluß an einen Zusatz von Trypsin oder Chymotrypsin (Figur 3a). Es entstanden Protease-resistente Fragmente mit jeweils circa 33-35 kDa Masse (Figur 3a). Diese Protease-resistenten Fragmente enthalten keine immunogenen Anteile des Passagierproteins. Dies konnte durch Western-Blot-Analyse von Ganzzell-Lysaten unter Verwendung eines Anti-Choleratoxin B Serums im Vergleich von Protease-verdauten und unverdauten FP59-exprimierenden E.coli gezeigt werden (Figur 4b und Vergleich von 4a und 4b).

Durch N-terminale Ansequenzierung der membrangeschützten Trypsinverdauungsprodukte wurde gefunden, daß die Membranlinkerregion beim AIDA-Autotransporter eine Länge von 55 Aminosäuren besitzt.

Mit den Proteaseverdauungen konnte auch die Integrität der Außenmembran von FP59-exprimierenden E.coli gezeigt werden (Abb. 4c). Dazu wurden Ganzzell-Lysate im Anschluß an den Verdau mit Trypsin durch Immunoblot mit einem Anti-OmpA-Serum entwickelt. Sowohl unverdaute Zellen als auch trypsinverdaute Zellen zeigten ein intaktes OmpA, wie es für Zellen mit einer intakten Außenmembran zu erwarten war.

Auch mit Immunfluoreszenzstudien ließ sich die Oberflächenexposition und starke Expression von FP59 zeigen (Figur 5). Durch Bindung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern läßt sich

die Oberflächenexposition eines Antigens auf einer Bakterienzelle bei intakter Außenmembran nachweisen. Dies zeigten FP59 exprimierende E.coli-Zellen durch starke Fluoreszenz an. Die als Negativkontrollen verwendeten E.coli Zellen mit periplasmatisch exprimiertem Cholera-toxin B, mit oberflächenexponiertem FP50 (Figur 3b) und mit nichtrekombinantem Klonierungsvektor waren eindeutig negativ. Das periplasmatische Cholera-toxin B demonstrierte die Unzugänglichkeit des Periplasmas für Antikörper (Figur 5b), durch das negative Resultat der Immunfluoreszenz mit FP50 konnte eine Kreuzreaktivität des verwendeten Antiserums (gegen das Passagierprotein) mit den AIDA-Anteilen von FP59 ausgeschlossen werden (Figur 5d). Die Immunfluoreszenz mit dem nichtrekombinanten Klonierungsvektor war ein Maß für die der Meßmethode innewohnende Hintergrundfärbung (Figur 5a). Außerdem war somit ein Vergleich der Expression von FP59 mit B61, dem von pTK61 produzierten, oberflächenpräsentierten Cholera-toxin B-Iga- β -Fusionsprotein möglich (Figuren 5c und 5e), wobei ebenfalls ein eindeutiger Vorteil des neuen erfindungsgemäßen Systems nachgewiesen werden konnte.

Beispiel 3:

Konstruktion einer oberflächenpräsentierten Peptidfusion

25

Ein Peptid, das als lineares Epitop für einen monoklonalen Antikörper (Dü142) fungiert, wurde auf der Oberfläche präsentiert und nachgewiesen. Zur Klonierung des Peptids wurde eine PCR-abhängige Strategie benutzt, die für die Generierung und Oberflächenexposition von Peptidbibliotheken äußerst geeignet ist. Dabei wird eine dreifache Genfusion aus dem Exportsignal von ctxB (Basen 1- 81), einer für ein Peptid kodierenden kurzen Sequenz (Basen 82-96) und der aida-linker/aida- β -Region (Basen 103-1450) gebildet.

35

pJM7 (Figur 3a) wurde mit XhoI linearisiert und als Matrize für eine PCR mit den Oligonukleotiden JM7 und JM20 (Figur 6)

benutzt (Figur 3b). Beide Oligonukleotide wiesen an ihren 5'-Enden eine KpnI-Erkennungssequenz auf. JM7 wurde so gewählt, daß bei seiner Verwendung in einer PCR die aida-linker/aida- β -Domänen amplifiziert wurden. JM20 wurde so gewählt, daß im PCR-Produkt die in ctxB enthaltene Signalsequenz für den Sec-abhängigen Membrantransport über die Cytoplasmamembran und die sechs daran anschließenden Codons mit enthalten waren. Außerdem enthielt JM20 in seiner 5'-ständigen, nicht zur Matrize komplementären Verlängerung, fünf Codons, die für das lineare Epitop des Antikörpers D μ 142 kodierten. Stromaufwärts dieser Codons lag die KpnI-Erkennungssequenz. Nach der PCR wurde das resultierende Produkt mit KpnI hydrolysiert, mit sich selbst ligiert und anschließend in E.coli transformiert. Die Identifizierung korrekter Genfusionen wurde mittels Kolonie-Immunoblot vorgenommen (ohne Figur). Der Nachweis der Expression und der Oberflächenexposition wurde in Analogie zu den in Beispiel 2 beschriebenen Methoden durch Western-Blot-Analyse von Proteaseverdauungen und Analyse von Proteinfärbungen im Gel (Figuren 4a,b,c) geführt.

Die Generierung umfassender Peptidbibliotheken ist durch eine geringfügige Änderung der hier beschriebenen Klonierungsstrategie machbar. Die für JM20 beschriebene Aufteilung der verschiedenen funktionellen Bereiche dieses Oligonukleotids muß dazu so geändert werden, daß der für das lineare Epitop kodierende Bereich durch einen Bereich ersetzt wird, der bei der Oligonukleotidsynthese gewollt der Degeneration unterworfen wird. Degeneration heißt, daß anstatt definierter Basen an allen Positionen dieses funktionellen Bereichs einzelne, mehrere, oder alle Basen durch ein Basengemisch aus bis zu vier verschiedenen Basen ersetzt werden. Dadurch kann jedes Codon anstatt für eine Aminosäure für bis zu 20 verschiedene Aminosäuren kodieren, wodurch ein Pool von kodierenden Sequenzen entsteht, die für alle denkbaren Kombinationen von Aminosäuren in einem Peptid der vorgegebenen Länge theoretisch möglich sind. Die Zelle, die das Peptid mit der ge-

wünschten Eigenschaft trägt kann nun vermittelt durch Bindung des oberflächenexponierten Peptids an einen Bindungspartner, der beispielsweise an eine Matrix immobilisiert vorliegt, Fluoreszenz-markiert ist oder an Magnetkugeln gekoppelt ist, isoliert werden und zur beständigen Produktion und Charakterisierung verwendet werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Präsentation von Peptiden oder/und Poly-
peptiden auf der Oberfläche von Gram-negativen Wirtsbak-
terien,
wobei man,

(a) ein Wirtsbakterium bereitstellt, das transformiert
mit einem Vektor, auf dem in operativer Verknüpfung
mit einem Promotor eine fusionierte Nukleinsäure-
sequenz lokalisiert ist, umfassend:

(i) einen Signalpeptid-kodierenden Nukleinsäure-
abschnitt,

(ii) einen für das zu präsentierende Passagierpep-
tid oder/und Passagierpolypeptid kodierenden
Nukleinsäureabschnitt,

(iii) gegebenenfalls einen für eine Proteaseerken-
nungsstelle kodierenden Nukleinsäureab-
schnitt,

(iv) einen für einen Transmembranlinker kodierenden
Nukleinsäureabschnitt und

(v) einen für eine Transporterdomäne eines Auto-
transporters kodierenden Nukleinsäureab-
schnitt; und

(b) das Wirtsbakterium unter Bedingungen kultiviert,
bei denen eine Expression der fusionierten Nuklein-
säuresequenz und eine Präsentation des von dem Nu-
kleinsäureabschnitt (ii) kodierten Peptids oder
Polypeptids an der Oberfläche des Wirtsbakteriums
erfolgt,

dadurch gekennzeichnet,

daß der Nukleinsäureabschnitt (ii) gegenüber dem für die
Transporterdomäne (v) kodierenden Nukleinsäureabschnitt
heterolog und das Wirtsbakterium gegenüber dem für die
Transporterdomäne (v) kodierenden Nukleinsäureabschnitt
homolog ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß der verwendete Autotransporter aus einer Gattung der
Enterobacteriaceae abgeleitet wurde und in einem Wirts-
5 bakterium einer Gattung der Enterobacteriaceae verwendet
wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
10 daß man die Transporterdomäne des Aida-Proteins aus
E.coli oder eine Variante davon verwendet.
4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
15 daß man die Transporterdomäne des SepA-Proteins aus Shi-
gella flexneri oder eine Variante davon verwendet.
5. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
20 daß man die Transporterdomäne des IcsA-Proteins aus Shi-
gella flexneri oder eine Variante davon verwendet.
6. Verfahren nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet,
25 daß man die Transporterdomäne des Tsh-Proteins aus
E.coli oder eine Variante davon verwendet.
7. Verfahren nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet,
30 daß man die Transporterdomäne des Ssp-Proteins aus Ser-
ratin marcescens oder eine Variante davon verwendet.
8. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
35 daß man die Transporterdomäne des Hsr-Proteins aus Hel-
icobacter mustelae, des Prn-Proteins aus Bordetella
ssp., des Hap-Proteins aus Haemophilus influenzae, des

BrkA-Proteins aus Bordetella pertussis, des VacA-Proteins aus Helicobacter pylori oder eines der Rickettsienproteine 190kDa Zelloberflächenprotein, SpaP, rOmpB oder SlpT, verwendet.

5

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß ein oder mehrere Peptide, insbesondere Peptide mit einer Länge von 4-50 Aminosäuren präsentiert werden.

10

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß ein oder mehrere eukaryontische Polypeptide präsentiert werden.

15

11. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß es sich bei dem Passagierpolypeptid um einen Antikörper oder eine Antigen bindende Domäne eines Antikörpers handelt, wobei Antigen bindende Domäne mindestens den Bereich eines Antikörpermoleküls bezeichnet, der hinreichend ist für die spezifische Bindung eines Antigens.

20

- 25 12. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß es sich bei dem Passagierpolypeptid um die α -Kette eines MHC Klasse II Moleküls handelt.

- 30 13. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß es sich bei dem Passagierpolypeptid um die β -Kette eines MHC-Klasse II Moleküls handelt.

- 35 14. Verfahren nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß es sich bei dem Passagierpolypeptid um die β -Kette

eines MHC Klasse II Moleküls handelt, an dem N-terminal Aminosäuren angehängt vorliegen, die sich als Peptid in die Bindungsgrube des funktionellen MHC Moleküls einlagern können.

5

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 -14,
dadurch gekennzeichnet,
daß Bibliotheken von varianten Passagierpeptiden oder
-polypeptiden erzeugt, in Wirtszellen exprimiert und an
10 der Oberfläche präsentiert werden.

15

16. Verfahren nach Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß die varianten Passagierpeptide oder -polypeptide in
einem konstanten Kontext eines Passagierpolypeptids prä-
sentierte werden.

20

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 16,
dadurch gekennzeichnet,
daß eine Wirtsbakterienzelle unterschiedliche Passagier-
peptide oder -polypeptide jeweils in Verbindung mit ei-
ner Transporterdomäne präsentiert.

25

18. Verfahren nach Anspruch 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß unterschiedliche Transporterdomänen in Verbindung
mit unterschiedlichen Passagierpeptiden oder -polypepti-
den verwendet werden.

30

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 - 18, weiterhin
umfassend den Schritt des Selektionierens einzelner Pas-
sagierpeptide oder -polypeptide aus einer Bibliothek von
varianten Peptiden oder Polypeptiden.

35

20. Verfahren zur Herstellung einer varianten Population von
oberflächenexponierten Peptiden oder Polypeptiden und
zur Identifizierung der Bakterien, die Peptide bzw. Po-

lypeptide mit einer jeweils gewünschten Eigenschaft tragen, wobei das Verfahren folgende Schritte umfaßt:

- 5 (1) Herstellen eines oder mehrerer Fusionsgene durch
 Klonierung der kodierenden Sequenz eines gewünschten
 Passagiers in frame mit der kodierenden Sequenz
 der Transporterdomäne eines Autotransporters und
 eines Signalpeptides in mindestens einen Vektor;
- 10 (2) Variieren des Passagierpeptids bzw. -polypeptids
 durch Mutagenese;
- (3) Einbringen des Vektors oder der Vektoren in Wirts-
 bakterien, die den Passagier oder die Passagiere
15 stabil an der Oberfläche präsentieren können,
- (4) Exprimieren des Fusionsgens bzw. der Fusionsgene in
 den Wirtsbakterien;
- 20 (5) Kultivieren der Bakterien zur Produktion des stabil
 oberflächenexponiert präsentierten Passagiers oder
 der stabil oberflächenexponiert präsentierten Pas-
 sagiere;
- 25 (6) gegebenenfalls Selektionieren der Bakterien, die
 den Passagier oder die Passagiere mit den gewünsch-
 ten Eigenschaften auf der Oberfläche tragen, und
- (7) gegebenenfalls Charakterisieren eines Bindungspart-
30 ners für den Passagier mit den optimalen Eigen-
 schaften.
21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei einzelne Schritte des
 Verfahrens weggelassen werden können.
- 35 22. Verfahren nach Anspruch 20, wobei das Verfahren mehrmals
 durchlaufen wird.

23. Verfahren nach Anspruch 20, wobei man die Transporterdomäne AIDA-I oder eine Variante davon verwendet.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 - 23, wobei das im Fusionsprotein enthaltene Passagierprotein ein Peptid oder Polypeptid mit einer Affinität zu einem Bindungspartner, ein Ligand, ein Rezeptor, ein Antigen, ein Toxin-bindendes Protein, ein Protein mit enzymatischer Aktivität, ein Nukleinsäure-bindendes Protein, ein Inhibitor, ein Chelator-Eigenschaften habendes Protein, ein Antikörper oder eine Antigen-bindende Domäne eines Antikörpers ist.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 - 24, wobei die Identifizierung des Bakteriums, das einen Passagier mit einer gewünschten Bindungsaffinität oberflächenexponiert präsentiert, durch Bindung an einen immobilisierten oder/und markierten Bindungspartner erfolgt.

26. Verfahren nach Anspruch 20, wobei der Bindungspartner so modifiziert ist, daß er in einem zweiten Schritt durch einen für die Modifikation spezifischen Bindungspartner... detektiert werden kann.

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 26, **dadurch gekennzeichnet**, daß Passagierproteine oder Teile davon auf der Bakterienoberfläche chemisch oder enzymatisch modifiziert werden.

28. Verfahren nach Anspruch 27, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Modifikation eine nicht-kovalente Modifikation ist.

29. Verfahren nach Anspruch 27, **dadurch gekennzeichnet**,

daß die Modifikation eine kovalente Modifikation ist.

30. Verfahren nach Anspruch 29,

dadurch gekennzeichnet,

5 daß die Modifikation eine Glykosylierung ist.

31. Verfahren nach Anspruch 29,

dadurch gekennzeichnet,

daß die Modifikation eine Phosphorylierung ist.

10

32. Verfahren nach Anspruch 27,

dadurch gekennzeichnet,

daß die Modifikation eine Proteolyse ist.

15 33. Verfahren nach Anspruch 32,

dadurch gekennzeichnet,

daß Passagierproteine oder Teile davon durch intrinsische oder extern zugeführte Proteasen selektiv von der Bakterienoberfläche freigesetzt werden.

20

34. Verfahren nach Anspruch 33,

dadurch gekennzeichnet,

daß Passagierproteine oder Teile davon durch eine intrinsische Protease der Wirtszelle, insbesondere die
25 OmpT-Protease, die OmpK-Protease oder die Protease X, freigesetzt werden.

35. Verfahren nach Anspruch 33,

dadurch gekennzeichnet,

30 daß Passagierproteine oder Teile davon durch eine extern zugeführte Protease, insbesondere die IgA-Protease, Thrombin oder Faktor X, freigesetzt werden.

36. Rekombinanter Vektor auf dem in operativer Verknüpfung

35 mit einem Promotor eine fusionierte Nukleinsäuresequenz lokalisiert ist, umfassend:

(i) einen Signalpeptid-kodierenden Nukleinsäureab-

schnitt,

(ii) einen für das zu präsentierende Passagierpeptid
oder/und Passagierpolypeptid kodierenden Nuklein-
säureabschnitt,

5 (iii) gegebenenfalls einen für eine Proteaseerkennung-
stelle kodierenden Nukleinsäureabschnitt,

(iv) einen für einen Transmembranlinker kodierenden Nu-
kleinsäureabschnitt und

(v) einen für eine Transporterdomäne eines Auto-

10 transporters kodierenden Nukleinsäureabschnitt;

wobei der Nukleinsäureabschnitt (ii) gegenüber dem für
die Transporterdomäne (v) kodierenden Nukleinsäureab-
schnitt heterolog ist.

15 37. Rekombinantes Gram-negatives Wirtsbakterium,
dadurch gekennzeichnet,
daß es mit einem Vektor nach Anspruch 36 transformiert
ist.

20 38. Wirtsbakterium nach Anspruch 37,
dadurch gekennzeichnet,
daß es gegenüber dem für die Transporterdomäne (v) ko-
dierenden Nukleinsäureabschnitt homolog ist.

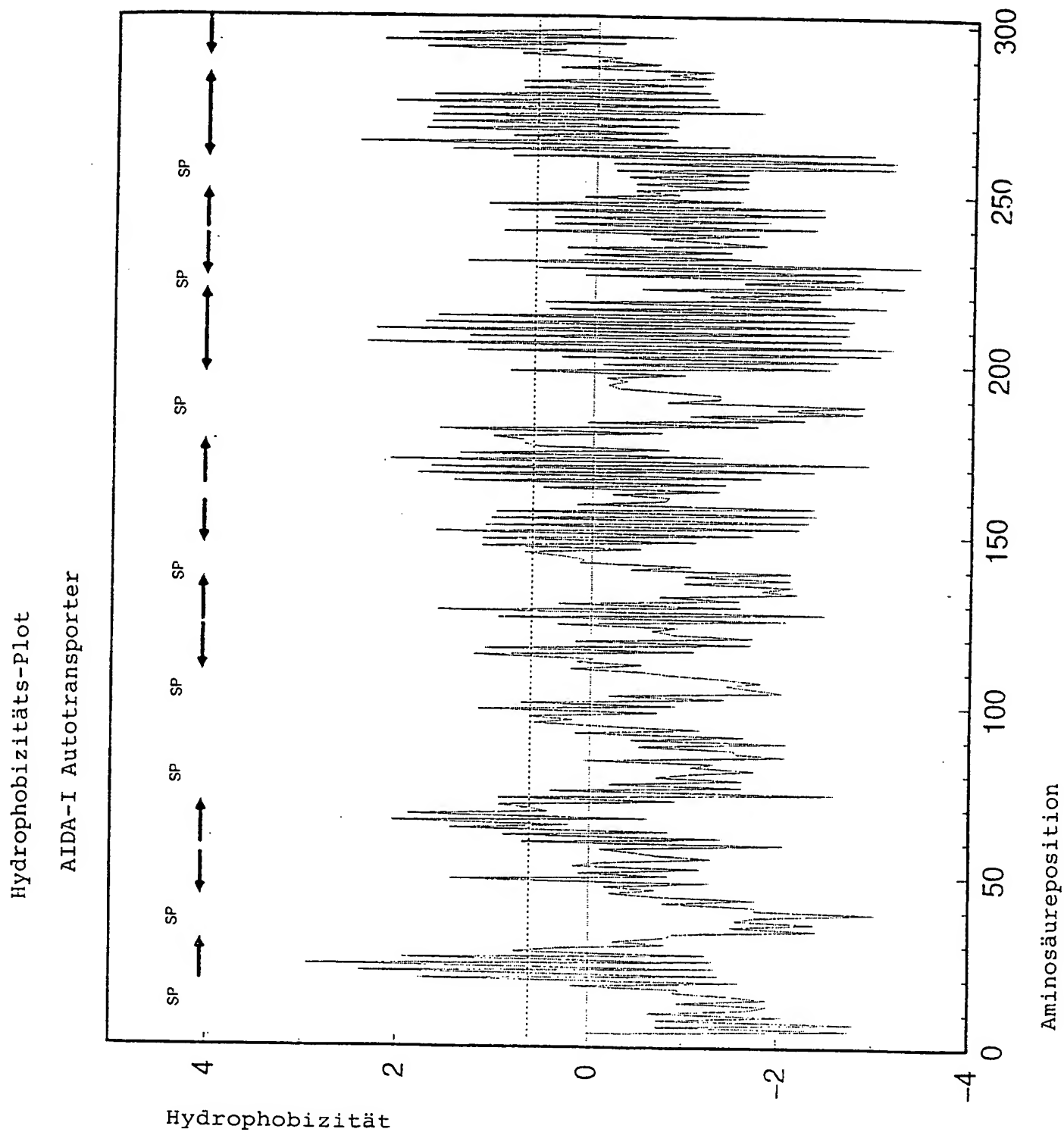
25 39. Wirtsbakterium nach Anspruch 38,
dadurch gekennzeichnet,
daß es eine E.coli Zelle ist.

30 40. Wirtsbakterium nach einem der Ansprüche 37 - 39,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Nukleinsäureabschnitt (v) für die Transporterdo-
mäne des AIDA-Proteins oder eine Variante davon kodiert.



1/20

Fig. 1





2/28

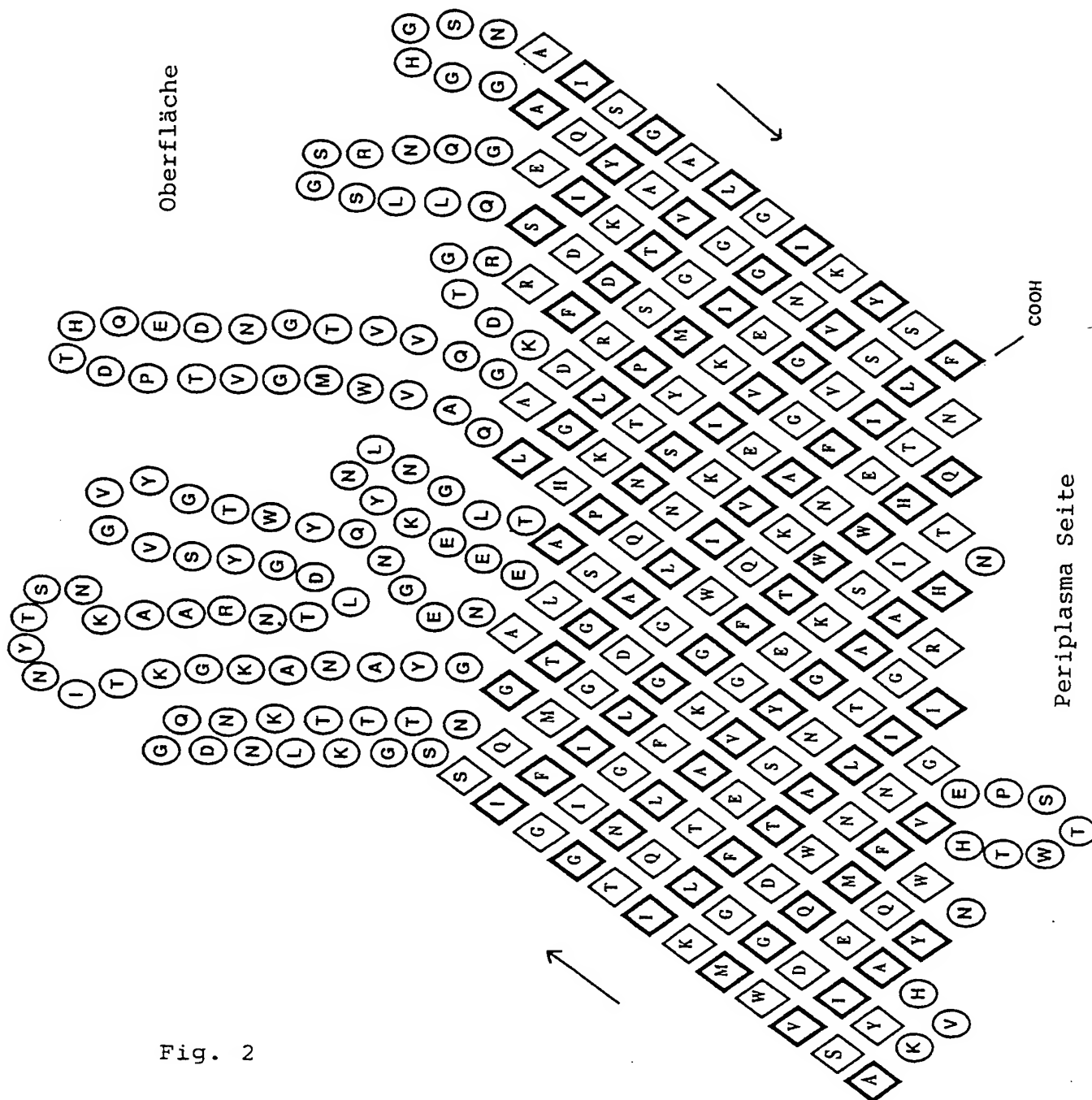


Fig. 2



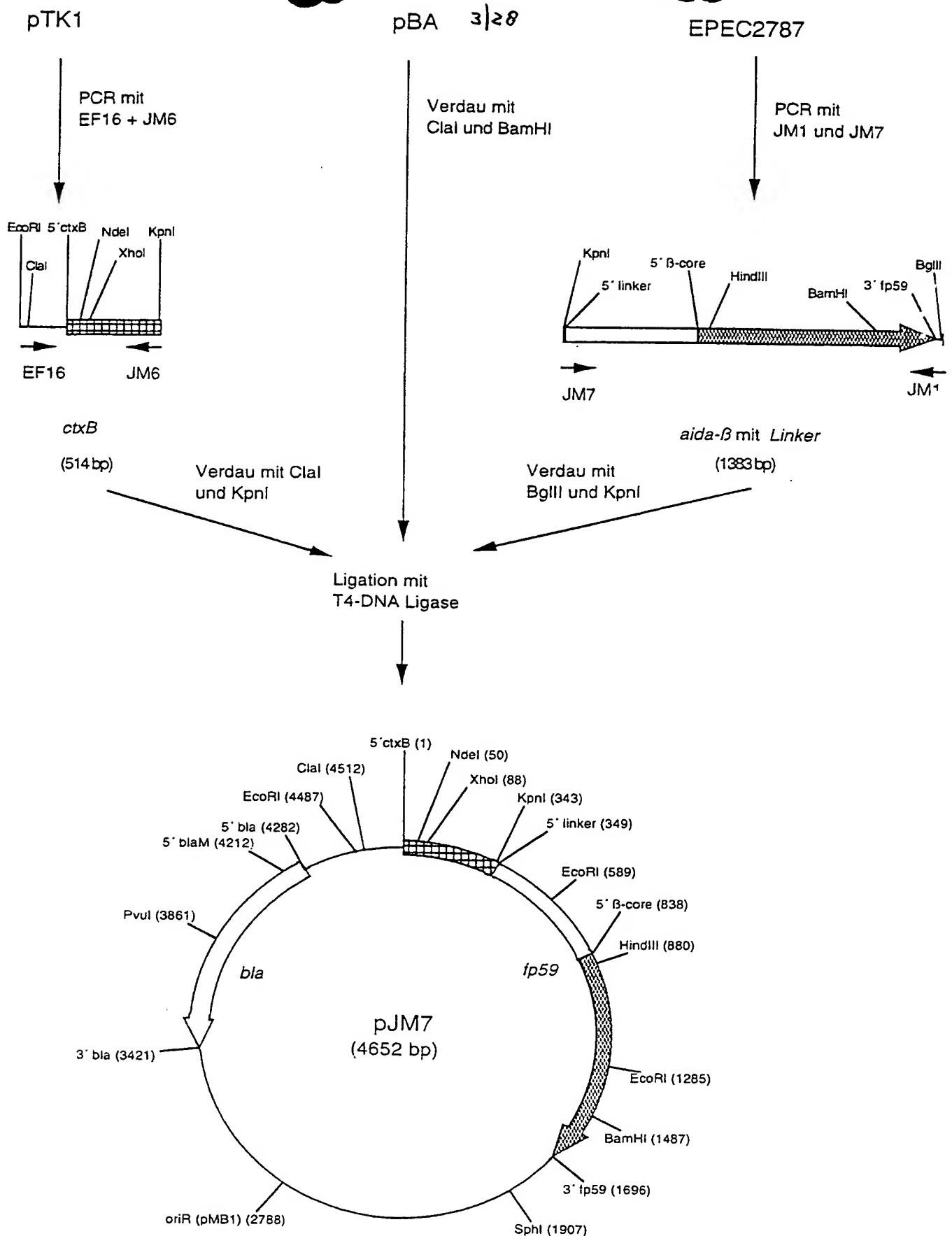
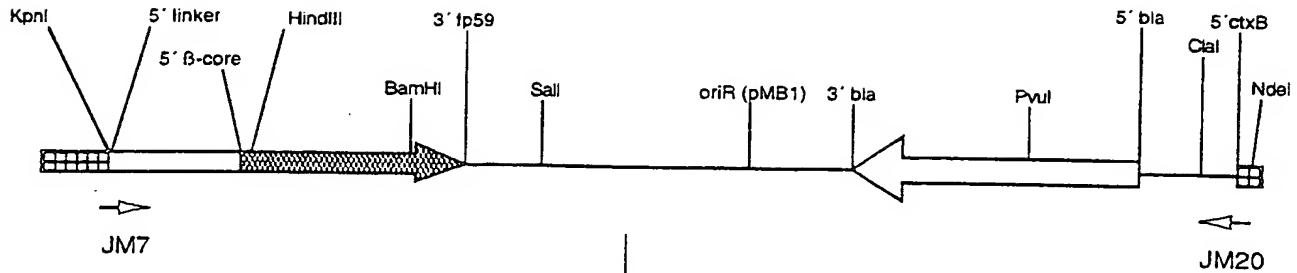


Fig. 3a



pJM7 4/28

Linearisieren
mit XhoI

PCR mit JM7 und JM20

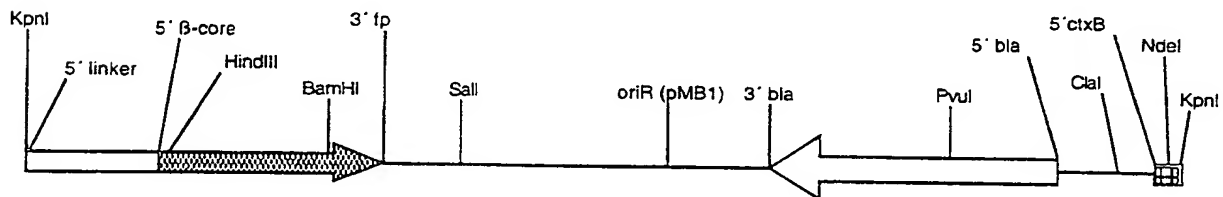
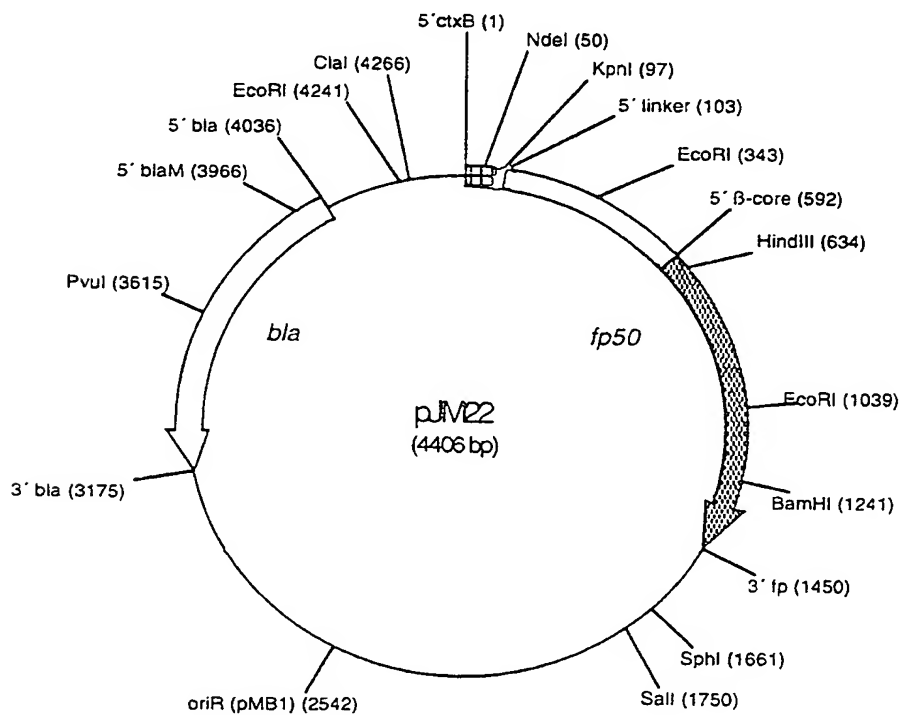
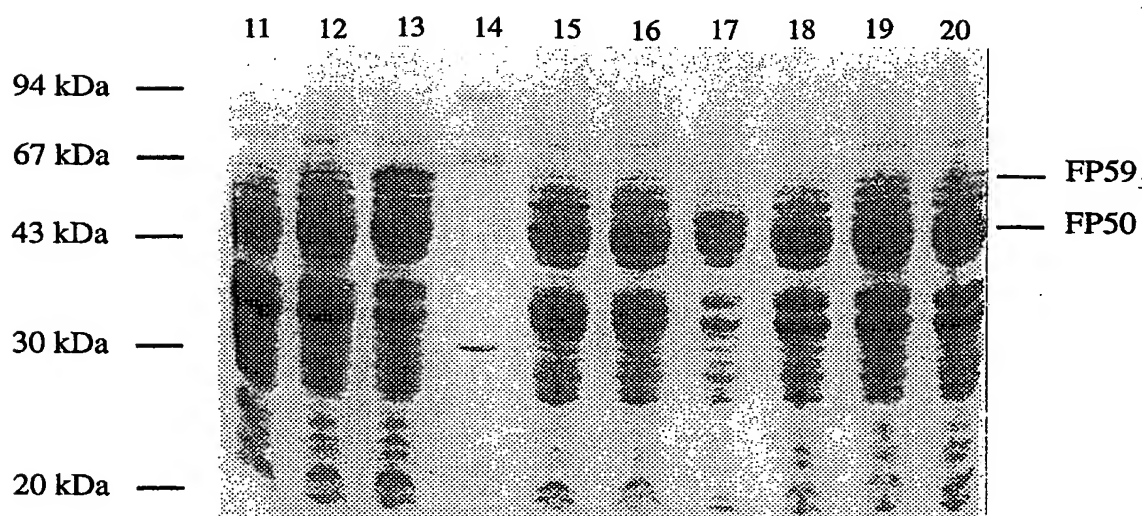
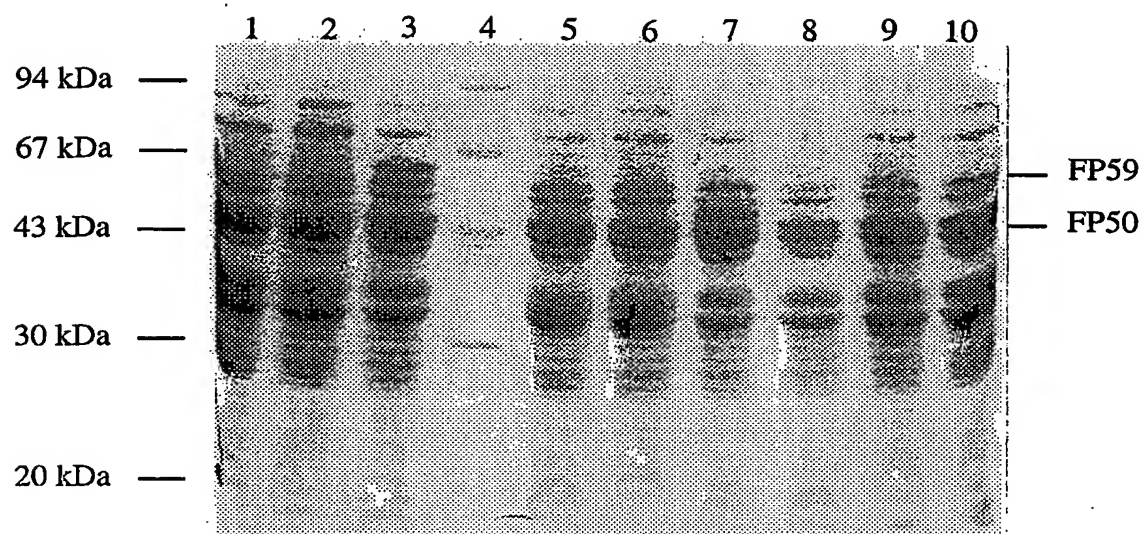
Verdau mit KpnI, Ligation
mit T4-DNA Ligase

Fig. 3b



Figur 4a)

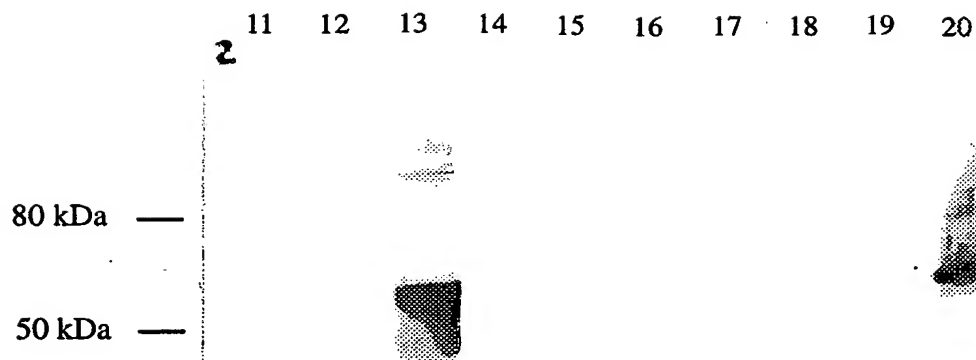
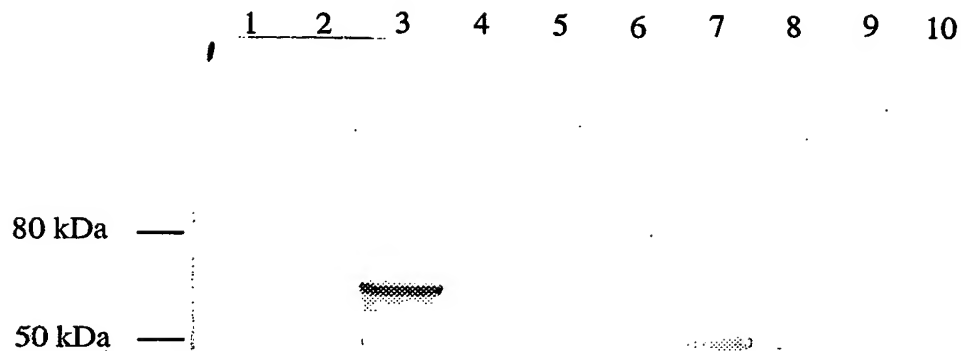
5/28





Figur 4b)

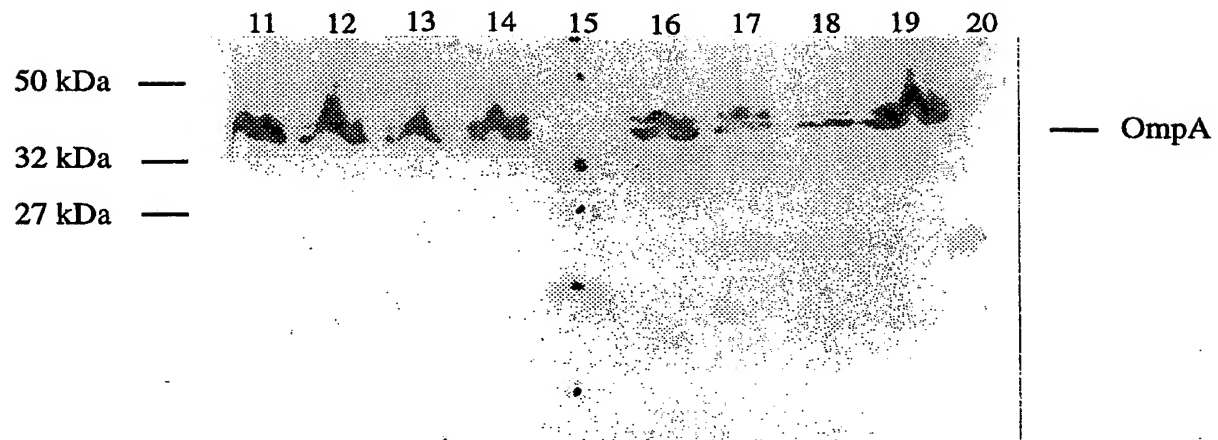
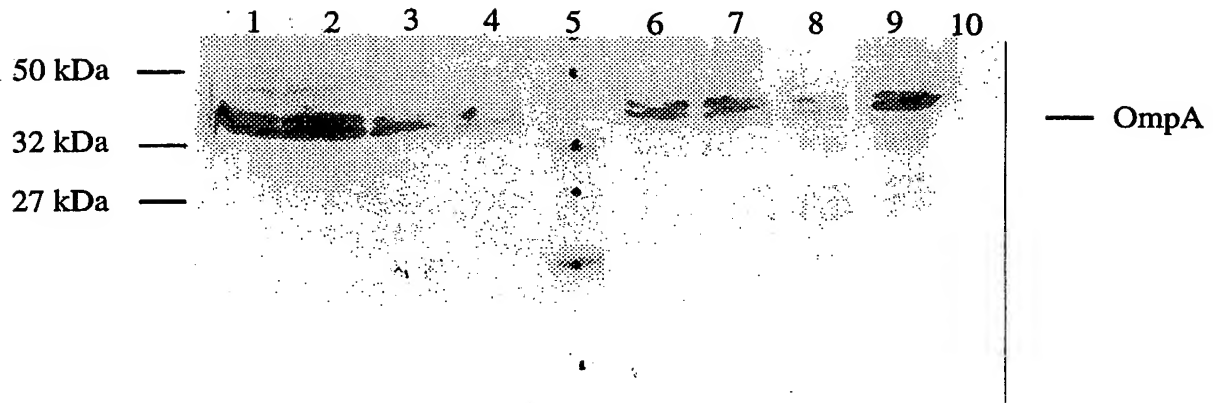
6/20





Figur 4c)

7/28

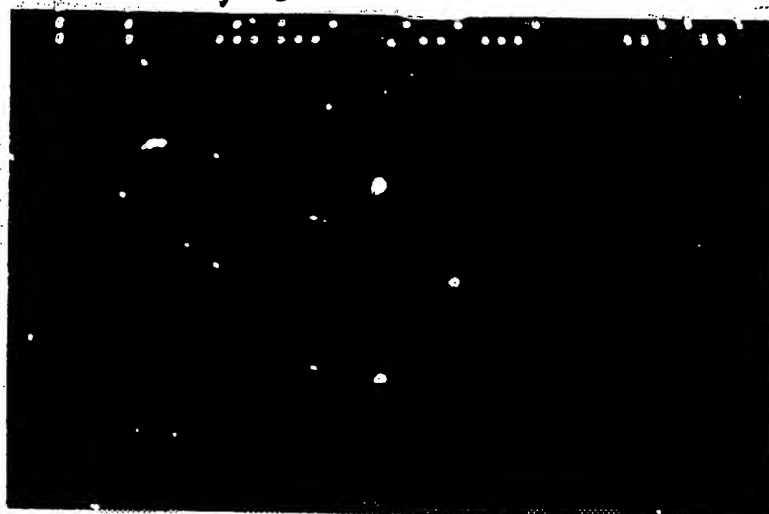




8/28

Figur 5

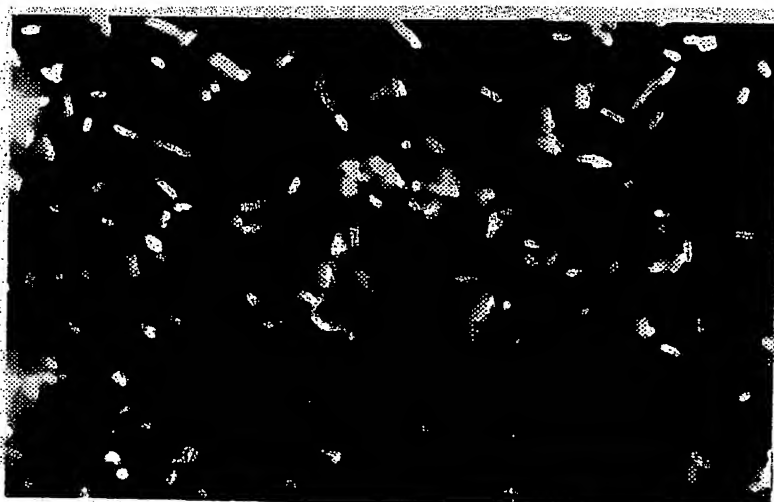
a) *E.coli* UT5600 pBA



b) *E.coli* UT5600 pTK1



c) *E.coli* UT5600 pJM7

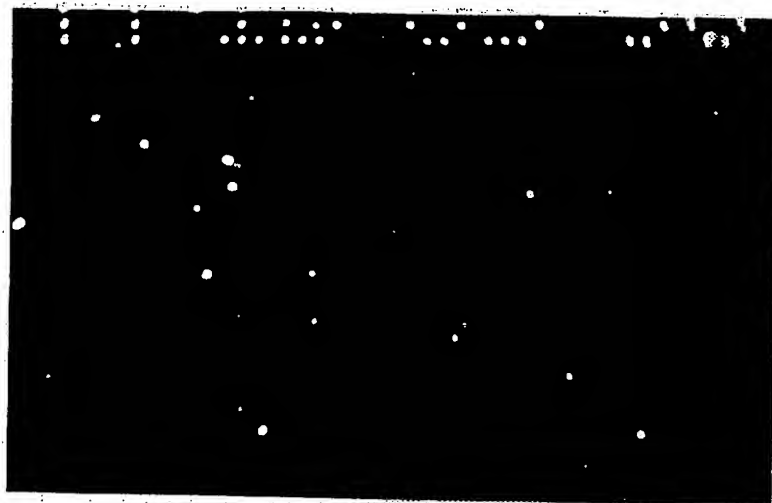




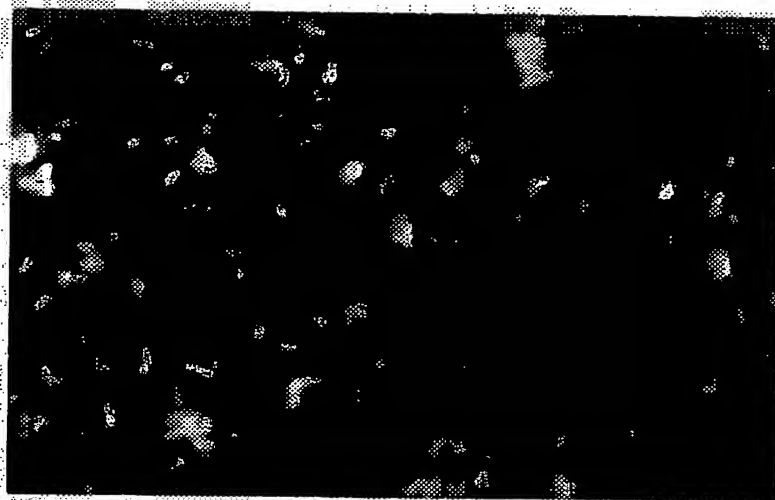
10/1/20

Figur 5

d) *E.coli* UT5600 pJM22



e) *E.coli* UT5600 pTK61





Figur 6

DNA-Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide 1 | 28

Name	Verwendung 1)	Länge (bp)	Sequenz (5'-3')
EF16	PCR (+)	36	TGTAAAACGACGGCCAGTATCACGAGG CCCTTTCGT
JM1	PCR (-)	27	GGAAGATCTGCCTCAGAAATGAGGGCC
JM6	PCR (-)	30	CATGGTACCAGGCGTTTTATTATCCCT AC
JM7	PCR (+)	30	CGGGGTACCCTTAATCCTACAAAAGAA AGT
JM20	PCR (+)	44	AAGGGTACCTTTGAAATACTCCGGAGTA ATATTTTTGAGGTGTTT

1)

(+) und (-) beziehen sich auf den kodierenden (+) bzw. den dazu komplementären DNA-Strang (-).



Figur 7

11/28

GCATCCGTGTGGATGAAGATCACTGGAGGAATAAGCTCTGGTAAGCTTAATGACGGGCAA
1 -----+-----+-----+-----+-----+ 60
A S V W M K I T G G I S S G K L N D G Q -
AATAAAACAACAACCAATCAGTTTATCAATCAGCTCGGGGGGATATTTATAAATTCCAT
61 -----+-----+-----+-----+-----+ 120
N K T T T N Q F I N Q L G G D I Y K F H -
GCTGAACAACCTGGGTGATTTTACCTTAGGGATTATGGGAGGATACGCGAATGCAAAAGGT
121 -----+-----+-----+-----+-----+ 180
A E Q L G D F T L G I M G G Y A N A K G -
AAAACGATAAATTACACGAGCAACAAAGCTGCCAGAAACACACTGGATGGTTATTCTGTC
181 -----+-----+-----+-----+-----+ 240
K T I N Y T S N K A A R N T L D G Y S V -
GGGGTATACGGTACGTGGTATCAGAATGGGGAAAATGCAACAGGGCTCTTTGCTGAAACT
241 -----+-----+-----+-----+-----+ 300
G V Y G T W Y Q N G E N A T G L F A E T -
TGGATGCAATATAACTGGTTTAAATGCATCAGTGAAAGGTGACGGACTGGAAGAAGAAAA
301 -----+-----+-----+-----+-----+ 360
W M Q Y N W F N A S V K G D G L E E E K -
TATAATCTGAATGGTTTAAACCGCTTCTGCAGGTGGGGGATATAACCTGAATGTGCACACA
361 -----+-----+-----+-----+-----+ 420
Y N L N G L T A S A G G G Y N L N V H T -
TGGACATCACCTGAAGGAATAACAGGTGAATTCTGGTTACAGCCTCATTTCAGGCTGTC
421 -----+-----+-----+-----+-----+ 480
W T S P E G I T G E F W L Q P H L Q A V -
TGGATGGGGGTTACACCGGATACACATCAGGAGGATAACGGAACGGTGGTGCAGGGAGCA
481 -----+-----+-----+-----+-----+ 540
W M G V T P D T H Q E D N G T V V Q G A -
GGGAAAAATAATATTCAGACAAAAGCAGGTATTCGTGCATCCTGGAAGGTGAAAAGCACC
541 -----+-----+-----+-----+-----+ 600
G K N N I Q T K A G I R A S W K V K S T -
CTGGATAAGGATACCGGGCGGAGGTTCCGTCCGTATATAGAGGCAAACCTGGATCCATAAC
601 -----+-----+-----+-----+-----+ 660
L D K D T G R R F R P Y I E A N W I H N -
ACTCATGAATTTGGTGTTAAAATGAGTGATGACAGCCAGTTGTTGTCAGGTAGCCGAAAT
661 -----+-----+-----+-----+-----+ 720
T H E F G V K M S D D S Q L L S G S R N -
CAGGGAGAGATAAAGACAGGTATTGAAGGGGTGATTACTCAAAACTTGTCAGTGAATGGC
721 -----+-----+-----+-----+-----+ 780
Q G E I K T G I E G V I T Q N L S V N G -
GGAGTCGCATATCAGGCAGGAGGTCACGGGAGCAATGCCATCTCCGGAGCACTGGGGATA
781 -----+-----+-----+-----+-----+ 840
G V A Y Q A G G H G S N A I S G A L G I -
AAATACAGCTTC
841 -----+----- 852
K Y S F -



Figur 8

12/20

CTGCGCCTGCGCGCCGACGCCGGCGGGCCATGGGCGCGTACGTTTCAGCGAGCGCCAGCAG
1 -----+-----+-----+-----+-----+ 60
L R L R A D A G G P W A R T F S E R Q Q -
ATCAGCAACCGCCACGCCCGCGCCTACGACCAGACGGTCAGCGGGCTGGAGATCGGCCCTG
61 -----+-----+-----+-----+-----+ 120
I S N R H A R A Y D Q T V S G L E I G L -
GACCGTGGCTGGAGCGCGTCGGGCGGGCGCTGGTACGCCGGCGGCCTGCTCGGCTACACC
121 -----+-----+-----+-----+-----+ 180
D R G W S A S G G R W Y A G G L L G Y T -
TATGCCGACCGCACCTATCCCGGCGACGGTGGCGGCAAGGTCAAGGGCCTGCACGTCGGC
181 -----+-----+-----+-----+-----+ 240
Y A D R T Y P G D G G G K V K G L H V G -
GGCTACGCCCGCCTATGTCGGCGATGGCGGCTACTATCTCGACACCGTGCTGCGGCTGGGC
241 -----+-----+-----+-----+-----+ 300
G Y A A Y V G D G G Y Y L D T V L R L G -
CGCTACGATCAGCAATACAACATTGCCGGCACCGATGGCGGCCCGCTACCGCCGACTAC
301 -----+-----+-----+-----+-----+ 360
R Y D Q Q Y N I A G T D G G R V T A D Y -
CGCACAAGCGGCGCCGCATGGTCGCTCGAAGGCGGGCGCCGGTTCGAGCTGCCCAACGAC
361 -----+-----+-----+-----+-----+ 420
R T S G A A W S L E G G R R F E L P N D -
TGGTTCGCCGAACCGCAGGCCGAGGTATGCTGTGGCGCACGTCAGGCAAGCGCTATCGC
421 -----+-----+-----+-----+-----+ 480
W F A E P Q A E V M L W R T S G K R Y R -
GCCAGCAATGGCCTGCGCGTCAAGGTGGACGCCAACACCGCCACGCTGGGCCCGCCTGGGC
481 -----+-----+-----+-----+-----+ 540
A S N G L R V K V D A N T A T L G R L G -
TTGCGCTTCGGCCGCGCATCGCCCTGGCCGGCGGCAACATCGTGCAGCCCTACGCCAGG
541 -----+-----+-----+-----+-----+ 600
L R F G R R I A L A G G N I V Q P Y A R -
CTCGGCTGGACGCAGGAGTTCAAAAGCACGGGCGATGTGCGCACCAATGGCATTGGCCAT
601 -----+-----+-----+-----+-----+ 660
L G W T Q E F K S T G D V R T N G I G H -
GCCGGCGCAGGCCGCCACGGCCGCGTGGAACTGGGCGCGGGCGTCGACGCCGCGTTGGGC
661 -----+-----+-----+-----+-----+ 720
A G A G R H G R V E L G A G V D A A L G -
AAGGGGCACAACCTCTATGCTTCGTACGAGTACGCGGCGGGCGACCGGATCAACATTCCG
721 -----+-----+-----+-----+-----+ 780
K G H N L Y A S Y E Y A A G D R I N I P -
TGGTCGTTCCACGCCGGCTACCGCTACAGCTTC
781 -----+-----+-----+-----+-----+ 813
W S F H A G Y R Y S F -



13128

ERSATZBLATT (REGEL 26)



Figur 10

14/28

ACCTCAATCTACACCACAGTACAGGCAGGATGGGATCATGTATTTGGCAGCGAGGGTGA
1-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
T S I Y T T V Q A G W D H V F G S E G G -
AATGACTTTTGTAGGTTTGTCTGTGGCTTATGCAGGTGCAGCGATGAGCTCTGAGAAGAAA
61-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
N D F L G F A V A Y A G A A M S S E K K -
GAACAGCTAGTAAATGGTGCACAAAAGGGAGTAAATCCAGCGGTGGAATGCCTTTGAA
121-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
E Q L V N G A Q K G V K S S G G N A F E -
ATCTCGCTCTACAACCTCTATGTACAAGATGGTGTCTTCTAGCACAGATTTCAAGTAT
181-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
I S L Y N S Y V Q D G A A S S T D F K Y -
GGTTTTTATAGTGATAGCGTGGCAAAATTCAGCTTCTTGTTGAACAAGCTTACAATGTTT
241-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
G F Y S D S V A K F S F L W N K L T M F -
GGTGAGGACAGCTCTCCTAACATGCAAACTTTGGTTTCACCTTCTCTCAAGAGATTGGT
301-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
G E D S S P N M Q N F G F T F S Q E I G -
TATCGCTTCTTGCTAGGAAATCACAACGAGTGGTATATCACTCCACAAGGGCAAGTTGCT
361-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
Y R F L L G N H N E W Y I T P Q G Q V A -
TTAGGTTATTTCAACCAAAGCAATATCAAGCAAACCCTAGGAAGCCACTGGCTAAAAGGC
421-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
L G Y F N Q S N I K Q T L G S H W L K G -
GAGCAAAGTTCTATCTTCACAGTGCAGGGCGAATTGGAAGCAACTTTGGTTATAGATTT
481-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
E Q S S I F T V Q G R I G S N F G Y R F -
AATCAATTCAGTGAAGACAAGGGCTGGGCTTCAGAGCTTTATTTGGGCTGTGGTACATC
541-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
N Q F T E D K G W A S E L Y L G L W Y I -
GGCGATTATATCAGTGGTGGCAATCTTACCCTCGTGTCTGACCTAGGTTCTGTAAACACT
601-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
G D Y I S G G N L T L V S D L G S V N T -
TTAAGGACTTTGAGCTCTACTGGTAGATTTGCCTTTAACATTGGTACAAACTTCGTCGTC
661-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
L R T L S S T G R F A F N I G T N F V V -
AAAGATAATCATAGATTCTACTTTGATTTTGAAAGAAGCTTTGGAGGCAAAATCATCACA
721-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
K D N H R F Y F D F E R S F G G K I I T -
GATTACCAATTCAACATTGGCTATCGCTATAACTTTGGCGAAAACAGAAAATACGTTTCT
781-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
D Y Q F N I G Y R Y N F G E N R K Y V S -
CTTCTGCAGGTAGTATGAAAGACACTATCAAAAAAGATGATAAGAAAGAAAACAAAGAA
841-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
L L A G S M K D T I K K D D K K E N K E -
GAGACAGAAGAAATTGAG
901-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 918
E T E E I E -



Figur 11

15/28

```

1  GAAACCACCATGTGGATTGCTACTGTTGGTGGACATAATGAGCATAATTTAGCTGATAGA
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   E T T M W I R T V G G H N E H N L A D R - 60

61  CAATTA AAAACACAGCTAACAGGATGGTTTATCAGATTGGTGGAGATATTTGAAGACA
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   Q L K T T A N R M V Y Q I G G D I L K T - 120

121 AACTTCACTGATCATGATGGCTTGCATGTGGGTATTATGGGAGCTTATGGATATCAGGAT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   N F T D H D G L H V G I M G A Y G Y Q D - 180

181 AGCAAACTCATAATAAGTATACTAGTTATAGTTCACGAGGAACGTGAGCGGTTATACT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   S K T H N K Y T S Y S S R G T V S G Y T - 240

241 GCCGGTTTGTACAGTTCTTGGTTTCAGGATGAAAAAGAACGAACAGGTCTATATATGGAT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   A G L Y S S W F Q D E K E R T G L Y M D - 300

301 GCTTGGTTGCAGTACAGTTGGTTTAATAATACAGTCAAAGGAGATGGGTAACTGGTGAG
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   A W L Q Y S W F N N T V K G D G L T G E - 360

361 AAATATTCCAGCAAAGGAATAACAGGAGCTTTGGAAGCTGGCTATATCTACCCAACCATA
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   K Y S S K G I T G A L E A G Y I Y P T I - 420

421 CGCTGGACTGCTCATAATAATATTGACAACGCATTGTATCTCAATCCACAAGTCCAGATA
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   R W T A H N N I D N A L Y L N P Q V Q I - 480

481 ACTAGGCATGGGGTAAAAGCAAACGACTATATTGAACACAATGGCACTATGGTCACATCC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   T R H G V K A N D Y I E H N G T M V T S - 540

541 TCTGGGGGCAATAATATTCAAGCAAAATTGGGATTGCGTACATCCTTAATTAGTCAGAGT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   S G G N N I Q A K L G L R T S L I S Q S - 600

601 TGTATCGATAAGGAGACTCTTCGTAAGTTGGAACCATTTTGGGAAGTGAATTGGAATGG
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   C I D K E T L R K F E P F L E V N W K W - 660

661 AGCTCAAAGCAATATGGTGTAATTATGAATGGCATGTCAAATCACCAGATAGGCAACCGT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   S S K Q Y G V I M N G M S N H Q I G N R - 720

721 AATGTGATTGAACTCAAACTGGTGTGGGGGGCGCTTTCAGATAACCTAAGCATCTGG
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   N V I E L K T G V G G R L A D N L S I W - 780

781 GGAAACGTATCTCAGCAATTGGGTAAATAACAGTTACAGAGACACCCAAGGTATTTGGGT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   G N V S Q Q L G N N S Y R D T Q G I L G - 840

841 GTGAAATATACCTTC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   V K Y T F - 855

```



Figur 12

16/28

```
CTGGGCGAGTTGCGCCTGAATCCGGACGCCGGCGGCCTGGGGCCGCGGCTTCGCGCAA
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
  L G E L R L N P D A G G A W G R G F A Q -

CGCCAGCAGCTGGACAACCGCGCCGGGCGGCGCTTCGACCAGAAGGTGGCCGGCTTCGAG
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
  R Q Q L D N R A G R R F D Q K V A G F E -

CTGGGCGCCGACCACGCGGTGGCGGTGGCCGGCGGACGCTGGCACCTGGGCGGGCTGGCC
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
  L G A D H A V A V A G G R W H L G G L A -

GGCTATACGCGCGGCGACCGCGGCTTCACCGCGACGGCGGCGGCCACACCGACAGCGTG
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
  G Y T R G D R G F T G D G G G H T D S V -

CATGTCGGGGGCTATGCCACATATATCGCCGACAGCGGTTTCTACCTGGACGCGACGCTG
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
  H V G G Y A T Y I A D S G F Y L D A T L -

CGCGCCAGCCGCGCTGGAGAATGACTTCAAGGTGGCGGGCAGCGACGGGTACGCGGTCAAG
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
  R A S R L E N D F K V A G S D G Y A V K -

GGCAAGTACCGCACCCATGGGGTGGGCGCCTCGCTCGAGGCGGGCCGCGCTTTACCCAT
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
  G K Y R T H G V G A S L E A G R R F T H -

GCCGACGGCTGGTTCTCTCGAGCCGCGAGGCCGAGCTGGCGGTATTCCGGGCGGCGGCGGT
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
  A D G W F L E P Q A E L A V F R A G G G -

GCGTACCGCGCGGCCAACGGCCTGCGGGTGCGCGACGAAGCGGCAGCTCGGTGCTGGGT
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
  A Y R A A N G L R V R D E G G S S V L G -

CGCCTGGGCCTGGAGGTTCGCAAGCGCATCGAACTGGCAGGCGGCAGGCAGGTGCAGCCA
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
  R L G L E V G K R I E L A G G R Q V Q P -

TACATCAAGGCCAGCGTGCTGCAGGAGTTTCGACGGCGCGGGTACGGTACACACCAACGGC
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
  Y I K A S V L Q E F D G A G T V H T N G -

ATCGCGCACCGCACCGAACTGCGCGGCACGCGCGCCGAAGTGGGCCTGGGCATGGCCGCC
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
  I A H R T E L R G T R A E L G L G M A A -

GCGCTGGGCGCGGCCACAGCCTGTATGCCTCGTACGAGTACTCCAAGGGCCCGAAGCTG
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
  A L G R G H S L Y A S Y E Y S K G P K L -

GCCATGCCGTGGACCTTCCACGCGGGCTACCGGTACAGCTGG
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 822
  A M P W T F H A G Y R Y S W -
```



Figur 13

17/28

CTGGGCGAGTTGCGCCTGAATCCGGACGCCGGCGGCGCTTGGGGCCGCGGCTTCGCGCAA
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
L G E L R L N P D A G G A W G R G F A Q -

CGCCAGCAACTGGACAACCGCGCCGGGCGGCGCTTCGACCAGAAGGTGGCCGGCTTCGAG
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
R Q Q L D N R A G R R F D Q K V A G F E -

CTGGGCGCCGACCACGCGGTGGCGGTGGCCGGCGGGCGCTGGCACCTGGGCGGGCTGGCC
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
L G A D H A V A V A G G R W H L G G L A -

GGCTATACGCGCGCGACCGCGGCTTTACCGGCGACGGCGGCGGCCACACCGACAGCGTG
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
G Y T R G D R G F T G D G G G H T D S V -

CATGTCGGGGGCTATGCCACCTATATCGCCAACAGCGGTTTCTACCTGGACGCGACGCTG
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
H V G G Y A T Y I A N S G F Y L D A T L -

CGCGCCAGCCGCTCGAAAATGACTTCAAGGTGGCGGGCAGCGATGGGTACGCGGTCAAG
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
R A S R L E N D F K V A G S D G Y A V K -

GGCAAGTACCGCACCCATGGGGTAGGCGTCTCGCTCGAGGCGGGCGGCGCTTCGCCCAT
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
G K Y R T H G V G V S L E A G R R F A H -

GCCGACGGCTGGTTCCCTCGAGCCGCGAGGCCGAGCTGGCGGTGTTCCGGGTGCGCGGCGGT
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
A D G W F L E P Q A E L A V F R V G G G -

GCGTACCGCGCGGCCAATGGCCTGCGGGTGC GCGACGAAGGCGGCAGCTCGGTGCTGGGT
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
A Y R A A N G L R V R D E G G S S V L G -

CGCCTGGGCCTGGAGGTGCGCAAGCGCATCGAACTGGCAGGCGGCAGGCAGGTGCAGCCA
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
R L G L E V G K R I E L A G G R Q V Q P -

TACATCAAGGCCAGCGTGTTCAGGAGTTCGACGGCGCGGGTACGGTACGCACCAACGGC
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
Y I K A S V L Q E F D G A G T V R T N G -

ATCGCGCATCGCACCGAACTGCGCGGCACGCGCGCCGAACCTGGGCCTGGGCATGGCCGCC
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
I A H R T E L R G T R A E L G L G M A A -

GCGCTGGGCGCGGCCACAGCCTGTATGCCTCGTACGAGTACTCCAAGGGCCCGAAGCTG
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
A L G R G H S L Y A S Y E Y S K G P K L -

GCCATGCCGTGGACCTTCCACGCGGGCTACCGGTACAGCTGG
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 822
A M P W T F H A G Y R Y S W -



Figur 14

18/28

AAGTTTGGTGGCGTGGATAAGCCCGTTTGTGCGTAATGCAACGCAGAAGATGTGTAACAGT
1 -----+-----+-----+-----+-----+ 60
K F G A W I S P F V G N A T Q K M C N S -
ATAAGTGGTTATAAGTCTGATACAACCTGGTGGCACTATAGGTTTTGACGGCTTCGTTAGC
61 -----+-----+-----+-----+-----+ 120
I S G Y K S D T T G G T I G F D G F V S -
GATGATCTAGCACTCGGACTTGCATATACAAGAGCCGATACTGACATTAAGCTAAAAAAT
121 -----+-----+-----+-----+-----+ 180
D D L A L G L A Y T R A D T D I K L K N -
AATAAAACGGGCGATAAGAATAAGGTAGAGAGCAACATCTATTCTTTATACGGTTTATAT
181 -----+-----+-----+-----+-----+ 240
N K T G D K N K V E S N I Y S L Y G L Y -
AATGTACCTTATGAAAATCTCTTCGTTGAAGCTATAGCATCTTACTCAGATAATAAGATA
241 -----+-----+-----+-----+-----+ 300
N V P Y E N L F V E A I A S Y S D N K I -
AGAAGCAAATCAAGACGTGTTATTGCAACGACACTAGAGACTGTCGGTTATCAAACCTGCA
301 -----+-----+-----+-----+-----+ 360
R S K S R R V I A T T L E T V G Y Q T A -
AACGGTAAGTATAAATCCGAAAGCTATACAGGTCAGTTAATGGCTGGTTATACCTATATG
361 -----+-----+-----+-----+-----+ 420
N G K Y K S E S Y T G Q L M A G Y T Y M -
ATGCCTGAGAACATTAACCTTAACACCGCTAGCTGGGCTTAGATATTCGACTATCAAAGAT
421 -----+-----+-----+-----+-----+ 480
M P E N I N L T P L A G L R Y S T I K D -
AAGGGCTATAAGGAAACCGGTACTACTTACCAAATCTTACCGTTAAAGGCAAGAACTAT
481 -----+-----+-----+-----+-----+ 540
K G Y K E T G T T Y Q N L T V K G K N Y -
AATACTTTTCGACGGTTTACTCGGTGCTAAAGTATCAAGTAATATCAATGTCAATGAAATA
541 -----+-----+-----+-----+-----+ 600
N T F D G L L G A K V S S N I N V N E I -
GTGCTAACACCTGAGCTTTACGCAATGGTCGATTATGCATTCAAGAATAAAGTTTCGGCG
601 -----+-----+-----+-----+-----+ 660
V L T P E L Y A M V D Y A F K N K V S A -
ATTGATGCAAGGTTACAAGGTATGACTGCTCCTCTTCCAACCAACAGCTTTAAGCAAAGC
661 -----+-----+-----+-----+-----+ 720
I D A R L Q G M T A P L P T N S F K Q S -
AAAACAAGTTTTGATGTCGGTGTGCGGTGTTACTGCTAAGCATAAAATGATGGAATACAGG
721 -----+-----+-----+-----+-----+ 780
K T S F D V G V G V T A K H K M M E Y R -
ATTAACCTACGATACCAATATCGGAAGTAAGTATTTTCGCTCAGCAAGGTAGTGTAAGTT
781 -----+-----+-----+-----+-----+ 840
I N Y D T N I G S K Y F A Q Q G S V K V -
CGTGTTAATTTT
841 -----+-----+-----+-----+ 852
R V N F -



Figur 15

19/20

TCTTATGGTGTATGGGCTAAACCTTTCTATAACATTGCAGAACAAGACAAAAAAGGTGGT
1-----+-----+-----+-----+-----+ 60
S Y G V W A K P F Y N I A E Q D K K G G -
ATAGCTGGTTATAAAGCAAAACTACTGGGGTTGTAGTTGGTTTAGATACTCTCGCTAGC
61-----+-----+-----+-----+-----+ 120
I A G Y K A K T T G V V V G L D T L A S -
GATAACCTAATGATTGGGGCAGCTATTGGGATCACTAAACTGATATAAACACCAAGAT
121-----+-----+-----+-----+-----+ 180
D N L M I G A A I G I T K T D I K H Q D -
TATAAGAAAGGTGATAAACTGATATTAATGGTTTATCATTCTCTCTATATGGTTCCCAA
181-----+-----+-----+-----+-----+ 240
Y K K G D K T D I N G L S F S L Y G S Q -
CAGCTTGTTAAGAATTTCTTTGCTCAAGGTAATTCAATCTTTACCTTAAACAAAGTCAAA
241-----+-----+-----+-----+-----+ 300
Q L V K N F F A Q G N S I F T L N K V K -
AGTAAAAGTCAGCGTTACTTCTTCGAGTCTAATGGTAAGATGAGCAAGCAAATTGCTGCT
301-----+-----+-----+-----+-----+ 360
S K S Q R Y F F E S N G K M S K Q I A A -
GGTAATTACGATAACATGACATTTGGTGGTAATTTAATATTTGGTTATGATTATAATGCA
361-----+-----+-----+-----+-----+ 420
G N Y D N M T F G G N L I F G Y D Y N A -
ATGCCAAATGTATTAGTAACTCCAATGGCAGGACTTAGCTACTTAAATCTTCTAATGAA
421-----+-----+-----+-----+-----+ 480
M P N V L V T P M A G L S Y L K S S N E -
AATTATAAGAAACCGGTACAACAGTTGCAAATAAGCGCATTAAATAGCAAATTTAGTGAT
481-----+-----+-----+-----+-----+ 540
N Y K E T G T T V A N K R I N S K F S D -
AGAGTCGATTTAATAGTAGGGGCTAAAGTAGCTGGTAGTACTGTGAATATAACTGATATT
541-----+-----+-----+-----+-----+ 600
R V D L I V G A K V A G S T V N I T D I -
GTGATATATCCGAAATTCATTCTTTTGTGGTGCACAAAGTAAATGGTAAATTATCTAAC
601-----+-----+-----+-----+-----+ 660
V I Y P E I H S F V V H K V N G K L S N -
TCTCAGTCTATGTTAGATGGACAAACTGCTCCATTTATCAGTCAACCTGATAGAAGTCT
661-----+-----+-----+-----+-----+ 720
S Q S M L D G Q T A P F I S Q P D R T A -
AAAACGTCTTATAATATAGGCTTAAGTGCAAACATAAAATCTGATGCTAAGATGGAGTAT
721-----+-----+-----+-----+-----+ 780
K T S Y N I G L S A N I K S D A K M E Y -
GGTATCGGTTATGATTTTAATTCTGCAAGTAAATATACTGCACATCAAGGTACTTTAAAA
781-----+-----+-----+-----+-----+ 840
G I G Y D F N S A S K Y T A H Q G T L K -
GTACGTGTAAACTTC
841-----+-----+ 855
V R V N F -



Figur 16

20/20

GCTTACGGTATATGGGCAAACCTTTCTATACTGATGCACATCAAAGTAAGAAAGGTGGT
1 -----+-----+-----+-----+-----+ 60
A Y G I W A K P F Y T D A H Q S K K G G -
TTAGCTGGTTATAAAGCTAAAACCACCGGTGTCGTAATCGGTTTAGATACGCTAGCTAAC
61 -----+-----+-----+-----+-----+ 120
L A G Y K A K T T G V V I G L D T L A N -
GATAATTTAATGATCGGTGCTGCTATCGGTATCACTAAACTGATATAAAACATCAAGAT
121 -----+-----+-----+-----+-----+ 180
D N L M I G A A I G I T K T D I K H Q D -
TATAAGAAAGGTGATAAAACCGACGTTAACGGTTTCTCATTCTCTCTATATGGTGCCAG
181 -----+-----+-----+-----+-----+ 240
Y K K G D K T D V N G F S F S L Y G A Q -
CAGCTTGTTAAGAACTTCTTTGCTCAAGGTAGTGCAATATTTAGCTTAAACCAAGTGAAG
241 -----+-----+-----+-----+-----+ 300
Q L V K N F F A Q G S A I F S L N Q V K -
AACAAAGTCAGCGTTACTTCTTCGATGCTAACGGTAATATGAGCAAGCAAATTGCTGCC
301 -----+-----+-----+-----+-----+ 360
N K S Q R Y F F D A N G N M S K Q I A A -
GGTCATTACGATAACATGACATTTGGTGGTAACTTAACAGTCGGTTATGATTACAATGCA
361 -----+-----+-----+-----+-----+ 420
G H Y D N M T F G G N L T V G Y D Y N A -
ATGCAAGGTGTGTTAGTAACTCCAATGGCAGGACTTAGCTACTTAAAGTCTTCTGACGAA
421 -----+-----+-----+-----+-----+ 480
M Q G V L V T P M A G L S Y L K S S D E -
AACTACAAAGAAACCGGTACAACAGTTGCAAACAAGCAAGTTAACAGCAAATTTAGCGAT
481 -----+-----+-----+-----+-----+ 540
N Y K E T G T T V A N K Q V N S K F S D -
AGAACCGATTTAATAGTAGGTGCTAAAGTAGCCGGCAGTACTATGAACATAACTGATCTT
541 -----+-----+-----+-----+-----+ 600
R T D L I V G A K V A G S T M N I T D L -
GCGGTATATCCAGAAGTTCACGCTTTTGTGGTTCACAAAGTAACCGGTAGATTATCTAAA
601 -----+-----+-----+-----+-----+ 660
A V Y P E V H A F V V H K V T G R L S K -
ACTCAGTCTGTATTAGACGGACAAGTTACTCCGTGTATCAACCAGCCTGACAGAACCACT
661 -----+-----+-----+-----+-----+ 720
T Q S V L D G Q V T P C I N Q P D R T T -
AAAACATCTTATAATTTAGGTTTAAAGTGAAGCATAAGATCTGATGCTAAGATGGAGTAC
721 -----+-----+-----+-----+-----+ 780
K T S Y N L G L S A S I R S D A K M E Y -
GGAATCGGTTACGATGCTCAGATTTCAAGTAAATATACTGCACATCAAGGTACTCTAAAA
781 -----+-----+-----+-----+-----+ 840
G I G Y D A Q I S S K Y T A H Q G T L K -
GTCCGTGTAAACTTC
841 -----+-----+-----+-----+-----+ 855
V R V N F -



Figur 17

21/28

TCTTATGGTGTATGGGCTAAACCTTTCTATAACATCGCAGAACAAGATAAAAAAGGTGGT
1 -----+-----+-----+-----+-----+ 60
S Y G V W A K P F Y N I A E Q D K K G G -
CTAGCTGGTTATAAAGCAAAACTGCTGGTGTGTAGTTGGTTTAGATACTCTCGCTAAT
61 -----+-----+-----+-----+-----+ 120
L A G Y K A K T A G V V V G L D T L A N -
GATAACCTAATGATTGGTGCAGCTATTGGTATCACTAAACTGACATAAAACACCAAGAT
121 -----+-----+-----+-----+-----+ 180
D N L M I G A A I G I T K T D I K H Q D -
TATAAAAAAGGTGATAAACTGATATTAAGGGTTTATCCTTCTCTCTATATGGTGCCAG
181 -----+-----+-----+-----+-----+ 240
Y K K G D K T D I K G L S F S L Y G A Q -
CAGCTTGTTAAGAATTTCTTTGCTCAAGGTAGTGCAATATTTACCTTAAACAAAGTCAAA
241 -----+-----+-----+-----+-----+ 300
Q L V K N F F A Q G S A I F T L N K V K -
AGTAAAGTCAGCGTTACTTCTTCGATGCTAATGGTAAGATGAACAAGCAAATTGCTGCC
301 -----+-----+-----+-----+-----+ 360
S K S Q R Y F F D A N G K M N K Q I A A -
GGTAATTATGATAACATAACATTCGGTGGTAATTTAATGTTTGGTTATGATTATAATGCA
361 -----+-----+-----+-----+-----+ 420
G N Y D N I T F G G N L M F G Y D Y N A -
CTGCAAGGTGTATTAGTGACTCCAATGGCAGGGCTTAGCTACTTAAATCTTCTAATGAA
421 -----+-----+-----+-----+-----+ 480
L Q G V L V T P M A G L S Y L K S S N E -
AACTATAAAGAACTGGTACTACAGTTGCAAATAAGCGCATTACAGCAAATTTAGTGAT
481 -----+-----+-----+-----+-----+ 540
N Y K E T G T T V A N K R I H S K F S D -
AGAATCGATTTAATAGTAGGTGCTAAAGTAAGTGGTAGTGCTATGAATATAAATGATATT
541 -----+-----+-----+-----+-----+ 600
R I D L I V G A K V T G S A M N I N D I -
GTGATATATCCAGAAATTCATTCTTTTGTAGTGACAAAAGTAAATGGTAAGCTATCTAAG
601 -----+-----+-----+-----+-----+ 660
V I Y P E I H S F V V H K V N G K L S K -
GCTCAGTCTATGTTAGATGGACAAACTGCTCCATTTATCAGTCAGCCTGATAGAACTGCT
661 -----+-----+-----+-----+-----+ 720
A Q S M L D G Q T A P F I S Q P D R T A -
AAAACATCTTATAATATAGGCTTAAGTGCAAATATAAGATCTGATGCTAAGATGGAGTAT
721 -----+-----+-----+-----+-----+ 780
K T S Y N I G L S A N I R S D A K M E Y -
GGTATCGGTTATGATTTTAAATGCTGCAAGTAAATATACTGCACATCAAGGTACTTTAAAA
781 -----+-----+-----+-----+-----+ 840
G I G Y D F N A A S K Y T A H Q G T L K -
GTACGTATAAATTC
841 -----+-----+-----+-----+ 855
V R I N F -



Figur 18

22/28

1 CAGGGGGATGCCGGTGTCTGGGCACGCATAATGAATGGTACCGGTTCGGCAGATGGTGAC
Q G D A G V W A R I M N G T G S A D G D 60
61 TACAGCGATAACTACACTCACGTTTCAGATTGGTGTGACAGAAAGCATGAGCTGGACGGT
Y S D N Y T H V Q I G V D R K H E L D G 120
121 GTGGATTTATTTACGGGGGCATTGCTGACCTATACGGACAGCAATGCAAGCAGCCACGCA
V D L F T G A L L T Y T D S N A S S H A 180
181 TTCAGTGGAAAAACAATCCGTGGGTGGCGGTCTGTATGCCTCTGCACTCTTTAATTCC
F S G K N K S V G G G L Y A S A L F N S 240
241 GGAGCTTATTTTGACCTGATTGGTAAATATCTCCATCATGATAATCAGCACACGGCGAAT
G A Y F D L I G K Y L H H D N Q H T A N 300
301 TTTGCCTCACTGGGAACAAAAGACTACAGCTCTCATTCCTGGTATGCCGGTGTGAAGTT
F A S L G T K D Y S S H S W Y A G A E V 360
361 GGTATCGTTACCACCTGACGAAAGAGTCCTGGGTGGAGCCACAGATAGAGCTGGTTTAC
G Y R Y H L T K E S W V E P Q I E L V Y 420
421 GGTCTGTATCAGGAAAAGCTTTTAGCTGGGAAGCCCGGGGAATGGCTCTGAGCATGAAA
G S V S G K A F S W E A R G M A L S M K 480
481 GACAAGGATTATAACCCACTGATTGGCCGTAAGTGGTGTGACGTGGGAAGAGCCTTCTCC
D K D Y N P L I G R T G V D V G R A F S 540
541 GGAGACGACTGGAAAATCACAGCTCGAGCCGGCTGGGTATCAGTTCGACCTGCTGGCG
G D D W K I T A R A G L G Y Q F D L L A 600
601 AACGGAGAAACGGTTCTGCAGGATGCTTCCGGAGAGAAACGTTTCGAAGGTGAAAAAGAT
N G E T V L Q D A S G E K R F E G E K D 660
661 AGCAGGATGCTGATGACGGTAGGGATGAATGCGGAAATTAAGGATAATATGCGTTTGGGA
S R M L M T V G M N A E I K D N M R L G 720
721 CTGGAGCTGGAGAAATCAGCGTTCGGGAAATATAATGTGGATAATGCGATAAACGCCAAC
L E L E K S A F G K Y N V D N A I N A N 780
781 TTCCGTTATGTTTTC 795
F R Y V F -



Figur 19

23/20

```

ACCCGTCAACTGTCCGGCCAGATCCACGCGGATATGGCGTCCGCCAGATTAACGAAAGC
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
T R Q L S G Q I H A D M A S A Q I N E S -

CGTTATCTGCGCGATACCGCCACCGAGCGGTTGCGCCAGGCCGATGGCCGCCGACCGCT
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
R Y L R D T A T E R L R Q A D G R R T A -

TCCGATATCAAAGCGGATGATAATGGCGCCTGGGCGAAATTGCTGGGCAACTGGGGGCAT
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
S D I K A D D N G A W A K L L G N W G H -

GCTTCCGGCAACGACAACGCTACCGGTTACCAGACATCCACCTATGGCGTGTCTGTTGGGT
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
A S G N D N A T G Y Q T S T Y G V L L G -

CTGGACAGCGAACTGTTTGACGACGGCCGGCTGGGCGTGATGACCGGGTATACCCGCACG
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
L D S E L F D D G R L G V M T G Y T R T -

TCGCTGGTAGGCGGTCTACAGTCAGTAGTCCACAGCGACACTACACATCTGGGGCTGTAC
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
S L V G G L Q S V V H S D T T H L G L Y -

GGCGACAAACGCTTCGGCGCGTTGGCGCTGCCAGCGGGCGGCACCTATACCTGGCATCGC
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
G D K R F G A L A L P A G G T Y T W H R -

ATCGACACGTCGCGCTCGGTAAACTACGGCGCGCAGGCGGATCGCGAAAAGGCCCGCTAT
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
I D T S R S V N Y G A Q A D R E K A R Y -

AACGCGCGCACCGGTCAGCTGTTTATCGAAAGCGGCTACGATTGGAGCAACGACGTGGTC
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
N A R T G Q L F I E S G Y D W S N D V V -

AATCTTGAGCCGTTTCGCCAACCTGGCGTACACCCACTATCGCAACGAGGGGATCAACGAG
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
N L E P F A N L A Y T H Y R N E G I N E -

CAAGGCGGGGCGGCGGCGCTGCGCGGCGATAAGCAAAGTCAGTCCGCCACCGCTTCGACG
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
Q G G A A A L R G D K Q S Q S A T A S T -

CTGGGCCTGCGCGCCGATACGCAATGGCAGACCGACAGCGTGGCGATCGCCCTGCCGGGC
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
L G L R A D T Q W Q T D S V A I A L P G -

GAGCTGGGTTGGCAACATCAGTACGGCAAGCTGGAGCGTAAAACACAGCTGATGTTCAA
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
E L G W Q H Q Y G K L E R K T Q L M F K -

CGCAGCGATGTGCGGTTGACGTGAACAGCGTCCCTGTTTCTCGCGATGGGGCCATTCTG
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
R S D V A F D V N S V P V S R D G A I L -

AAAGCGGGCGTTCGATGTATCGATTAACAAAAACGTCGTCTCTGTCCTTGGGTACGGCGGG
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
K A G V D V S I N K N V V L S L G Y G G -

CAGCTGTCGTCCAACCACAGGACAACAGCGTCAACGCCGGCCTGACCTGGCGGTTTC
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 957
Q L S S N H Q D N S V N A G L T W R F

```



Figur 20

24/28

```

1  ACCCGTCAACTGTCCGGCCAGATCCACGCGGATATGGCTTCCGCCCAGATCAACGAAAGC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   T R Q L S G Q I H A D M A S A Q I N E S - 60

61  CGTTACCTGCGCGATACCGCCACCGAGCGCTTGCGCCAGGCGGAAGGCCGCGCACCGCT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   R Y L R D T A T E R L R Q A E G R R T A - 120

121  ACCGACATTAAAGCGGATGACAACGGCGCCTGGGCGAAACTGCTGGGTAGCTGGGGGCAT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   T D I K A D D N G A W A K L L G S W G H - 180

181  GCTTCCGGCAACGACAACGCCACCGGTTACCAGACCTCCACCTATGGCGTGCTGTTAGGT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   A S G N D N A T G Y Q T S T Y G V L L G - 240

241  CTGGACAGCGAACTGTTTGGCGACGGCCGGCTTGCGCATGATGACCGGGTATACCCGCACT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   L D S E L F G D G R L G M M T G Y T R T - 300

301  TCGCTGGATGGAGGTTATCAGTCAGATGCTCACAGCGACAACCTACCATCTGGGGCTGTAC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   S L D G G Y Q S D A H S D N Y H L G L Y - 360

361  GCGGACAAACGCTTCCGGCGGTTGGCGCTGCGAGCGGGCGGCACCTATACCTGGCATCGC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   G D K R F G A L A L R A G G T Y T W H R - 420

421  ATCGACACCTCGCGTTCGGTGAACCTACGGCGCGCAGTCGGATCGCGAGAAGGCCAAGTAT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   I D T S R S V N Y G A Q S D R E K A K Y - 480

481  AACGCGCGCACCGGTCAGCTGTTTCATCGAAAGCGGCTACGATTGGACGAGCGATGCGGTC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   N A R T G Q L F I E S G Y D W T S D A V - 540

541  AACCTTGAGCCGTTCCGCAACCTGGCGTATACCCATTACCGTAACGAGGAGATCAACGAG
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   N L E P F A N L A Y T H Y R N E E I N E - 600

601  CAAGGCGGGGCGACGGCGCTGCGCGGCGACAAACAAAGTCAGTCCGCCACCGCCTCGACG
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   Q G G A A A L R G D K Q S Q S A T A S T - 660

661  TTGGGTCTGCGCGCCGACACCGAGTGGCAAACCGACAGCGTGGCGATCGCGCTGCGCGGC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   L G L R A D T E W Q T D S V A I A L R G - 720

721  GAGCTGGGTTGGCAGCATCAGTACGGCAAGCTGGAGCGTAAAACGCAGCTGATGTTCAAA
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   E L G W Q H Q Y G K L E R K T Q L M F K - 780

781  CGCACTGATGCGGCGTTCGACGTGAACAGCGTGCCTGTTTCTCGCGATGGCGCGATTCTG
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   R T D A A F D V N S V P V S R D G A I L - 840

841  AAAGCGGGCGTCGATGTATCGATTAAACAAAACGCCGTCCTGTCCCTTGCTACGGCGGG
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   K A G V D V S I N K N A V L S L G Y G G - 900

901  CAGCTGTCGTCCAACCAACAGGACAACAGCGTCAACGCCGGTCTGACCTGGCGCTTC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   Q L S S N H Q D N S V N A G L T W R F - 957

```



Figur 21

25/28

```
TTCCGTCAGCTGTCGGGGCAAATCCATGCGGACATCGCGTCGGCGCTGGTGAACGACAGC
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
F R Q L S G Q I H A D I A S A L V N D S -
CGCTACCTGCGTGAGGCGCTGAACGGGCGTCTGCGTCAGGCGGAAGGGCTGGCGAGCTCG
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
R Y L R E A L N G R L R Q A E G L A S S -
TCGGCCATCAAGGCGGACGAGGACGGCGCCTGGGCGCAGCTGCTGGGAGCGTGGGACCAT
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
S A I K A D E D G A W A Q L L G A W D H -
GCGTCGGGCGACGCCAACGCCACCGCTATCAGGCCTCGACCTACGGGGTGTCTGGTGGGG
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
A S G D A N A T G Y Q A S T Y G V L V G -
CTGGACTCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
L D S A A A A D W R L G V A T G Y T R T -
TCGCTGCACGGCGGGTATGGGTGCAAGGCGGACAGCGACAACCTACCACCTGGCGGCGTAC
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
S L H G G Y G S K A D S D N Y H L A A Y -
GGCGACAAGCAGTTTCGGGGCGCTGGCGCTGCGGGGCGGGGCGGGGCTACACCTGGCACCGC
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
G D K Q F G A L A L R G G A G Y T W H R -
ATCGACACCAAGCGGTTCGGTGAACCTACGGGATGCAGTCGGACCGCGACACGGCGAAGTAC
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
I D T K R S V N Y G M Q S D R D T A K Y -
AGCGCGCGCACCGAGCAGCTGTTTCGGCGGAAGCGGGCTACAGCGTGAAGGGCGAGTGGCTG
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
S A R T E Q L F A E A G Y S V K G E W L -
AACCTGGAGCCGTTTCGTCAACCTGGCGTACGTGAACTTTGAAAACAACGGCATCGCGGAA
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
N L E P F V N L A Y V N F E N N G I A E -
AGCGGCGGCGCAGCGGCGCTGCGCGGCGACAAGCAGCACACCGACGCGACGGTGTTCGACG
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
S G G A A A L R G D K Q H T D A T V S T -
CTGGGACTGCGCGCGGACACTGAGTGGCAGGTGAGCCCGGGCACGACGGTGGCGCTGCGC
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
L G L R A D T E W Q V S P G T T V A L R -
AGCGAGCTGGGGTGGCAACACCAGTACGGCGGGCTGGAGCGTGGCACCGGGCTGCGGTTTC
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
S E L G W Q H Q Y G G L E R G T G L R F -
AACGGCGGCAACGCGCCGTTTCGTGGTGGACAGCGTGCCGCTGTCGCGGACGGGATGGTG
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
N G G N A P F V V D S V P V S R D G M V -
CTGAAGGCGGGTGCAGGAAGTGGCGGTGAACGAGAACGCCCTCGCTGTCGCTGGGCTACGGC
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
L K A G A E V A V N E N A S L S L G Y G -
GGGCTGCTGTGCGAGAACCATCAGGACAACAGCGTCAACGCCGGCTTCACCTGGCGCTTC
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
G L L S Q N H Q D N S V N A G F T W R F -
```



Figur 22

26/28

TTCCGTCAGCTGTCGGGGCAAATCCATGCGGACATCGCGTGGCGCTGGTGAACGACAGC
1. -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
F R Q L S G Q I H A D I A S A L V N D S -
CGCTACCTGCGTGAGGCGCTGAACGGGCGTCTGCGTCAGGCGGAAGGGCTGGCGAGCTCG
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
R Y L R E A L N G R L R Q A E G L A S S -
TCGGCCATCAAGGCGGACGAGGACGGCGCCTGGGCGCAGCTGCTGGGAGCGTGGGACCAT
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
S A I K A D E D G A W A Q L L G A W D H -
GCGTCGGGCGACGCCAACGCCACCGGCTATCAGGCCTCGACCTACGGGGTGGTGGGG
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
A S G D A N A T G Y Q A S T Y G V L V G -
CTGGACTCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCTGGGCGGCTGGGCGACCGGCTACACCGCACC
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
L D S A A A A D W R L G V A T G Y T R T -
TCGCTGCACGGCGGGTATGGGTGCAAGGCGGACAGCGACAACCTACCACCTGGCGGCGTAC
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
S L H G G Y G S K A D S D N Y H L A A Y -
GGCGACAAGCAGTTCGGGGCGCTGGCGCTGCGGGGCGGGGCGGGCTACACCTGGCACCGC
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
G D K Q F G A L A L R G G A G Y T W H R -
ATCGACACCAAGCGGTTCGGTGAACCTACGGGATGCAGTCGGACCGCGACACGGCGAAGTAC
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
I D T K R S V N Y G M Q S D R D T A K Y -
AGCGCGCGCACCGAGCAGCTGTTTCGCGGAAGCGGGCTACAGCGTGAAGGGCGAGTGGCTG
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
S A R T E Q L F A E A G Y S V K G E W L -
AACCTGGAGCCGTTTCGTCAACCTGGCGTACGTGAACCTTTGAAAACAACGGCATCGCGGAA
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
N L E P F V N L A Y V N F E N N G I A E -
AGCGGCGGCGCAGCGGCGCTGCGCGGCGACAAGCAGCACACCGACGCGACGGTGTGACG
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
S G G A A A L R G D K Q H T D A T V S T -
CTGGGACTGCGCGCGGACACTGAGTGGCAGGTGAGCCCGGGCAGCAGGTGGCGCTGCGC
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
L G L R A D T E W Q V S P G T T V A L R -
AGCGAGCTGGGGTGGCAACACAGTACGGCGGGCTGGAGCGTGGCACCGGGCTGCGGTTTC
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
S E L G W Q H Q Y G G L E R G T G L R F -
AACGGCGGCAACGCGCCGTTTCGTGGTGGACAGCGTGCCGGTGTTCGCGGACGGGATGGTG
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
N G G N A P F V V D S V P V S R D G M V -
CTGAAGGCGGGTGCAGGAGTGGCGGTGAACGAGAAGCCTCGCTGTCGCTGGGCTACGGC
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
L K A G A E V A V N E N A S L S L G Y G -
GGGCTGCTGTCGAGAACCATCAGGACAACAGCGTCAACGCCGGCTTCACCTGGCGCTTC
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
G L L S Q N H Q D N S V N A G F T W R F -



Figur 23

27/20

1 ATTAATGGCGAAGCCGGTACGTGGGTGCGTCTGCTGAACGGTTCCGGCTCTGCTGATGGC 60
I N G E A G T W V R L L N G S G S A D G -

61 GGTTTCACTGACCACTATAACCCTGCTGCAGATGGGGGCTGACCGTAAGCACGAACCTGGGA 120
G F T D H Y T L L Q M G A D R K H E L G -

121 AGTATGGACCTGTTTACCGGCGTGATGGCCACCTACACTGACACAGATGCGTCAGCAGAC 180
S M D L F T G V M A T Y T D T D A S A D -

181 CTGTACAGCGGTAAACAAAATCATGGGGTGTTGTTTCTATGCCAGTGGTCTGTTCCGG 240
L Y S G K T K S W G G G F Y A S G L F R -

241 TCCGGCGCTTACTTTGATGTGATTGCCAAATATATTCACAATGAAAACAAATATGACCTG 300
S G A Y F D V I A K Y I H N E N K Y D L -

301 AACTTTGCCGGAGCTGGTAAACAGAACTTCCGCAGCCATTCACTGTATGCAGGTGCAGAA 360
N F A G A G K Q N F R S H S L Y A G A E -

361 GTCGGATACCGTTATCATCTGACAGATACGACGTTTGTGTAACCTCAGGCGGAACCTGGTC 420
V G Y R Y H L T D T T F V E P Q A E L V -

421 TGGGGAAGACTGCAGGGCCAAACATTTAACTGGAACGACAGTGGAAATGGATGTCTCAATG 480
W G R L Q G Q T F N W N D S G M D V S M -

481 CGTCGTAACAGCGTTAATCCTCTGGTAGGCAGAACCGGCGTTGTTTCCGGTAAACCTTC 540
R R N S V N P L V G R T G V V S G K T F -

541 AGTGGTAAGGACTGGAGTCTGACAGCCCGTGCCGGCCTGCATTATGAGTTTCGATCTGACG 600
S G K D W S L T A R A G L H Y E F D L T -

601 GACAGTGCTGACGTTTCATCTGAAGGATGCAGCGGGAGAACATCAGATTAATGGCAGAAAA 660
D S A D V H L K D A A G E H Q I N G R K -

661 GACAGTCGTATGCTTTACGGTGTGGGGTTAAATGCCCCGTTTGGCGACAATACGCGTTTG 720
D S R M L Y G V G L N A R F G D N T R L -

721 GGGCTGGAAGTTGAACGCTCTGCATTGTTGTAATAACAACAGATGATGCGATAAACGCT 780
G L E V E R S A F G K Y N T D D A I N A -

781 AATATTCGTTATTCATTC 798
N I R Y S F -



2

4

2

4

Figur 24

28/28

TCTTTAGAAAGCGCGGCGGAAGTGTGTATCAATTTGCCCTAAATATGAAAAACCCACC
1-----+-----+-----+-----+-----+ 60
S L E S A A E V L Y Q F A P K Y E K P T -

AATGTTTGGGCTAACGCTATTGGGGAACGAGCTTGAATAGTGGCGGTAACGCTTCATTG
61-----+-----+-----+-----+-----+ 120
N V W A N A I G G T S L N S G G N A S L -

TATGGCACAAGTGCGGGCGTAGATGCTTACCTTAACGGGGAAGTGAAGCCATTGTGGGC
121-----+-----+-----+-----+-----+ 180
Y G T S A G V D A Y L N G E V E A I V G -

GGTTTTGGAAGCTATGGTTATAGCTCCTTTAGTAATCAAGCGAACTCTCTTAACCTCTGGG
181-----+-----+-----+-----+-----+ 240
G F G S Y G Y S S F S N Q A N S L N S G -

GCCAATAACACTAATTTTGGCGTGTATAGCCGTATTTTGGCTAACGAGCATGAATTTGAC
241-----+-----+-----+-----+-----+ 300
A N N T N F G V Y S R I F A N Q H E F D -

TTTGAAGCTCAAGGGGCGCTAGGGAGTGATCAATCAAGCTTGAATTTCAAAGCGCTTTA
301-----+-----+-----+-----+-----+ 360
F E A Q G A L G S D Q S S L N F K S A L -

TTGCGAGATTTGAATCAAAGCTATAATTACTTAGCCTATAGCGCTGCAACAAGAGCGAGC
361-----+-----+-----+-----+-----+ 420
L R D L N Q S Y N Y L A Y S A A T R A S -

TATGGTTATGACTTCGCGTTTTTTAGGAACGCTTTGGTGTAAAACCAAGCGTGGGCGTG
421-----+-----+-----+-----+-----+ 480
Y G Y D F A F F R N A L V L K P S V G V -

AGCTATAACCATTTAGGTTCAACCACTTTAAAAGCAACAGCAATCAAAAAGTGGCTTTG
481-----+-----+-----+-----+-----+ 540
S Y N H L G S T N F K S N S N Q K V A L -

AAAAATGGTGCAAGCAGTCAGCATTTATTCAACGCTAGTGCTAATGTGGAAGCGCGCTAT
541-----+-----+-----+-----+-----+ 600
K N G A S S Q H L F N A S A N V E A R Y -

TATTATGGGGACACTTCATACTTCTACATGAACGCTGGAGTTTACAAGAGTTCGCTAAC
601-----+-----+-----+-----+-----+ 660
Y Y G D T S Y F Y M N A G V L Q E F A N -

TTTGGTTCTAGCAATGCGGTGTCTTTAAACACCTTTAAAGTGAATGCTACTCGTAACCTT
661-----+-----+-----+-----+-----+ 720
F G S S N A V S L N T F K V N A T R N P -

TTAAATACCCATGCGAGAGTGATGATGGGTGGGGAATTAAAATTAGCTAAAGAAGTGTTT
721-----+-----+-----+-----+-----+ 780
L N T H A R V M M G G E L K L A K E V F -

TTGAATTTGGGCTTTGTTTATTTGCACAATTTGATTTCCAATATAGGCCATTTGCTTCC
781-----+-----+-----+-----+-----+ 840
L N L G F V Y L H N L I S N I G H F A S -

AATTTAGGAATGAGGTATAGTTTC
841-----+-----+-----+-----+ 864
N L G M R Y S F -



2

4

6

8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Application No.

PC 96/01130

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/62 C12N15/65 C12N15/70 C07K16/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 17509 A (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.) 29 June 1995	21, 36, 37
Y	see page 8, line 1 - page 9, line 25 see page 10, line 26 - page 13, line 30; examples 2-5 --- -/--	1-25, 38-40

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 March 1997

Date of mailing of the international search report

17.04.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Donath, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 96/01130

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VACCINE, vol. 12, no. 6, May 1994, pages 492-498, XP000651455 RUPPERT, A. ET AL.: "OmpA-FMDV VP1 fusion proteins: production, cell surface exposure and immune responses to the major antigenic domain of foot-and-mouth disease virus"	21,36,37
Y	see the whole document	1,2,9, 10,15, 16,38
X	EMBO J., vol. 11, no. 6, 1992, pages 2327-2335, XP002028468 KLAUSER, T. ET AL.: "Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by Escherichia coli: dissection of Neisseria IgaA-mediated outer membrane transport" see the whole document	21,36,37
Y	MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 18, no. 2, 1995, pages 377-382, XP000651438 JOSE, J. ET AL.: "MicroCorrespondence: Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters" see page 378 - page 380	1-3, 5-10, 20-23, 38-40
Y	WO 93 10214 A (GEORGIU, G.) 27 May 1993 see page 6, line 6 - page 10, line 28 see page 12, line 4 - page 13, line 29	1-25
Y	BIO-TECHNOLOGY, vol. 14, no. 2, February 1996, pages 203-208, XP002028469 CORNELIS, P. ET AL.: "Development of new cloning vectors for the production of immunogenic outer membrane fusion proteins in Escherichia coli" see the whole document	1,2,9-11
Y	MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 17, no. 1, 1995, pages 123-135, XP000651454 BENJELLOUN-TOUIMI, Z. ET AL.: "SepA, the major extracellular protein of Shigella flexneri: autonomous secretion and involvement in tissue invasion" see the whole document	2,4
	-/--	

New Claims 20 to 38

20. Process for the preparation of an optionally variant population of surface-exposed peptides or polypeptides and for identification of the bacteria which carry peptides or polypeptides with a particular required property, where the process comprises the following steps:
- 10 (1) preparation of one or more fusion genes by cloning the coding sequence of a required passenger in frame with the coding sequence of the transporter domain of the AIDA protein from E.coli or of a variant thereof and of a signal peptide in at
15 least one vector;
 - (2) where appropriate variation of the passenger peptide or polypeptide by mutagenesis;
 - 20 (3) introduction of the vector or vectors into host bacteria able to present the passenger or passengers stably on the surface;
 - (4) expression of the fusion gene or fusion genes in
25 the host bacteria;
 - (5) cultivation of the bacteria to produce the passenger presented stably exposed on the surface or the passengers presented stably exposed on the
30 surface;
 - (6) where appropriate selection of the bacteria which carry the passenger or passengers having the required properties on the surface, and
35
 - (7) where appropriate characterization of a binding partner for the passenger having the optimal properties.



21. (22) Process according to Claim 20, where the process is performed several times.
22. 24 Process according to any of Claims 20-21, where the passenger protein present in the fusion protein is
- 5 a peptide or polypeptide having an affinity for a binding partner, or is a ligand, a receptor, an antigen, a toxin-binding protein, a protein with enzymatic activity, a nucleic acid-binding protein, an inhibitor, a protein having chelator properties, an
- 10 antibody or an antigen-binding domain of an antibody.
23. 25 Process according to any of Claims 20-22, where the bacterium which presents a surface-exposed passenger having a required binding affinity is identified by binding to an immobilized or/and labelled
- 15 binding partner.
24. 26 Process according to Claim 20, where the binding partner is modified so that it can be detected in a second step by a binding partner specific for the modification.
- 20 25. 27 Process according to any of Claims 1-24, characterized in that passenger proteins or parts thereof are chemically or enzymatically modified on the bacterial surface.
26. 28 Process according to Claim 25, characterized in
- 25 that the modification is a non-covalent modification.
27. 29 Process according to Claim 25, characterized in that the modification is a covalent modification.
28. 30 Process according to Claim 27, characterized in that the modification is a glycosylation.
- 30 29. 31 Process according to Claim 27, characterized in that the modification is a phosphorylation.
30. 32 Process according to Claim 25, characterized in that the modification is a proteolysis.
31. (33) Process according to Claim 30, characterized in
- 35 that passenger proteins or parts thereof are selectively released from the bacterial surface by intrinsic or externally added proteases.
32. 34 Process according to Claim 31, characterized in that passenger proteins or parts thereof are released



by an intrinsic protease of the host cell, in particular OmpT protease, OmpK protease or protease X.

33. ³⁵ Process according to Claim 32, characterized in that passenger proteins or parts thereof are released
5 by an externally added protease, in particular IgA protease, thrombin or factor X.

34. ³⁶ Recombinant vector on which is located, operatively linked to a promoter, a fused nucleic acid sequence comprising:

- 10 (i) a signal peptide-encoding nucleic acid section,
- (ii) a nucleic acid section coding for the passenger peptide or/and passenger polypeptide to be presented,
- (iii) where appropriate a nucleic acid section coding
15 for a protease recognition site,
- (iv) a nucleic acid section coding for a transmembrane linker and
- (v) a nucleic acid section coding for the transporter domain of the AIDA protein from
20 E.coli or a variant thereof;

where the nucleic acid section (ii) is heterologous in relation to the nucleic acid section coding for the transporter domain (v).

35. ³⁷ Recombinant Gram-negative host bacterium,
25 characterized in that it is transformed with a vector according to Claim 34.

36. ³⁸ Recombinant Gram-negative host bacterium which is transformed with a recombinant vector on which is located, operatively linked to a promoter, a fused
30 nucleic acid sequence comprising:

- (i) a signal peptide-encoding nucleic acid section,
- (ii) a nucleic acid section coding for the passenger peptide or/and passenger polypeptide to be presented,
- 35 (iii) where appropriate a nucleic acid section coding for a protease recognition site,
- (iv) a nucleic acid section coding for a transmembrane linker and



(v) a nucleic acid section coding for a transporter domain of an autotransporter;

where the nucleic acid section (ii) is heterologous in relation to the nucleic acid section coding for the transporter domain (v), and where the host bacterium is homologous in relation to the nucleic acid section coding for the transporter domain (v).

5

37. ~~39~~ Host bacterium according to Claim 36, characterized in that it is an E.coli cell.

10

38. ~~40~~ Host bacterium according to any of Claims 36-37, characterized in that the nucleic acid section (v) codes for the transporter domain of the AIDA protein or a variant thereof. .

